

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
28. November 2002 (28.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 02/095651 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G06F 19/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/01875

(22) Internationales Anmeldedatum:  
23. Mai 2002 (23.05.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 27 221.9 23. Mai 2001 (23.05.2001) DE  
101 27 220.0 23. Mai 2001 (23.05.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): LIFEBITS AG [DE/DE]; Albrechtstrasse 9, 72072  
Tübingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REXHAUSEN, Ul-  
rich [DE/DE]; Riedstrasse 22, 72810 Gomaringen (DE).  
WICK, Manfred [DE/DE]; Wächterstrasse 40, 72074  
Tübingen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE BIOCHEMICAL DETECTION OF ANALYTES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN FÜR BIOCHEMISCHE NACHWEISE VON ANALYTEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting and/or quantifying analytes from a sample on an analysis carrier that has been formatted using a digital data code. Detection fields comprising the sensor elements required for the respective detection process, together with additional data structures in a defined digital format, are provided on the analysis carrier and combined to form sequences of formatted structures that can be interpreted as code words. To detect and quantify an analyte in a sample, the latter is applied to the analysis carrier and the formation of signal-generating elements is initiated at locations of molecular interaction. The localisation of signal-generating elements in the respective detection fields causes a formatted structure at this location to be replaced by another. This leads to the conversion of one code word into another within the predetermined quantity of valid code words. Both code words can be sequentially read and interpreted in the predetermined format. The statement concerning a successful or unsuccessful reaction is based on a comparison of the respective code words prior to and after detection. Detection takes place using a reading device, which is preferably constructed from components of the consumer goods industry.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Detektion und/oder Quantifizierung von Analyten aus einer Probe auf einem mit einem digitalen Datencode formatierten Analysenträger. Auf dem Analysenträger sind Nachweisfelder mit den für den jeweiligen Nachweis benötigten Sensorelementen sowie weitere Datenstrukturen in einem definierten digitalen Format aufgebracht und zu Abfolgen von Formatstrukturen zusammengefasst, welche als Codewörter interpretiert werden können. Zum Nachweis und zur Quantifizierung eines Analyten in einer Probe wird diese auf den Analysenträger appliziert und die Ausbildung von signalgebenden Elementen an den Orten molekularer Interaktionen initiiert. Die Lokalisation von signalgebenden Elementen an den jeweiligen Nachweisfeldern bewirkt einen Austausch einer Formatstruktur an dieser Stelle gegen eine andere. Dies führt zur Umwandlung eines Codewortes in ein anderes innerhalb der vorgegebenen Menge von gültigen Codewörtern. Beide Codewörter können im vorgegebenen Format sequentiell gelesen und interpretiert werden. Die Aussage über eine erfolgte oder nicht erfolgte Reaktion basiert auf einem Vergleich der jeweiligen Codewörter vor und nach dem Nachweis. Die Detektion erfolgt mit einem Lesegerät, das vorzugsweise aus Komponenten der Konsumgüterindustrie aufgebaut ist.

WO 02/095651 A2

# Verfahren für biochemische Nachweise von Analyten

## Kurze Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Detektion und / oder Quantifizierung von Molekülen aus einer Probe auf einem mit digitalem Datencode formatierten Analysenträger, wobei eine Nachweisreaktion eine Änderung der Codewörter hervorruft, die im vorgegebenen Format sequentiell gelesen und interpretiert werden kann.

Oberflächen-basierte Nachweisverfahren sind seit vielen Jahren in den biochemischen Labors etabliert. Mit den wachsenden Anforderungen der molekularbiologischen Forschung wächst der Bedarf nach hochparallelisierten und miniaturisierten Techniken zum Studium von Bindungen in komplexen Molekülmischungen.

Die bekannten Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von Target-Molekülen aus einer Probe beinhalten mehrere Schritte, die mittels verschiedener, zum Teil aufwändiger und teurerer Geräte ausgeführt werden. Eine der Möglichkeiten zur Analyse einer Vielzahl von biologischen Molekülen sind Microarrays. Die Microarray-Technologie, bei der viele verschiedene Biomoleküle wie DNA oder Proteine dicht gepackt in einem vordefinierten Muster auf einer Substrat-Oberfläche aufgebracht sind, ist mittlerweile zur Standardmethode für die parallele Analyse biologischer Proben geworden. Diese Technologie wird z.B. bei der Analyse der Genexpression, bei der genetischen Diagnostik, in der biologischen und pharmazeutischen Forschung und zur Bestimmung genmanipulierter Organismen in der Lebensmittelindustrie verwendet.

Bei der Microarray-Technologie werden biochemische Sensormoleküle wie DNA oder Proteine auf Metall-, Glas-, Membran- oder Kunststoff-Oberflächen, insbesondere Polycarbonatträger, aufgebracht. Nach einem Kontakt mit der applizierten Probe wird ein Nachweis der molekularen Interaktion und meist auch eine Aussage über die gebundene Menge und / oder über die Stärke der Interaktion ermöglicht.

Nach Stand der Technik werden die Bindungen meist über die Erzeugung und Detektion eines optischen Signals nachgewiesen. Dabei wird üblicherweise ein Mikroskop oder ein funktional ähnliches Gerät, insbesondere ein CD-Lesekopf, eingesetzt (WO00/26677,

WO00/36398). Die Information über eine erfolgte oder nicht erfolgte Bindung an einer bestimmten Stelle wird durch Bildauswertung erhalten, welche bei Microarrays höherer Dichte typischerweise durch eine Computersoftware nach einer Analog-Digital-Wandlung erfolgt.

- 5 Bei einem der bekannten Verfahren wird die Information über eine erfolgte oder nicht erfolgte Bindung an einer bestimmten Stelle durch die Ablagerung von Körnchen (*Beads*) am Ort der Reaktion des Analyten mit dem trägergebundenen Sensormolekül markiert (z.B. EP918885 und Taton, Mirkin, Letsinger, *Science* 289:1757-1760 (2000)). Nach Stand der Technik werden solcherart gebundene Beads entweder direkt als Körper identifiziert oder sie  
10 bewirken eine chemische Umsetzung wie Farbumschlag oder Farbstoffpräzipitat. Diese werden im Wesentlichen mit photometrischen Methoden nachgewiesen. Eine Kombination von Kamera und Mikroskop dient zur Erzeugung von Daten, die durch eine Bildanalyse im Computer ausgewertet werden.

- Einer der Nachteile der bekannten Verfahren zur Auswertung der Microarray-Analysen ist  
15 die Verwendung von komplizierten und teuren Geräten und Software zur Detektion und Auswertung von sehr schwachen Signalen, z.B. bei der Emission weniger Moleküle von Fluoreszenzfarbstoffen. Diese Lese- und Auswertegeräte sind Ergebnis langjähriger Entwicklungsarbeit, verwenden aufwändige Methoden wie z.B. konfokale Rastermikroskopie und sind sehr teuer. Außerdem benötigen diese Geräte spezielle Software zur Identifizierung  
20 und Lokalisierung von Molekül-Spots und zur Interpretation und Integration detektierter Signale.

- In den nächsten Jahren werden erste Resultate der Genomforschung in die medizinische Diagnostik und Prognostik Einzug halten. Vor allem für die unterschiedlichen klinischen Fragestellungen werden einfache und schnelle molekulare Nachweisverfahren benötigt. Es  
25 besteht daher der Bedarf nach einer einfachen, preiswerten und mindestens zum Teil automatisierten Methode zur Detektion und Analyse von Molekülen in komplexen Gemischen. Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein schnelles und einfaches Verfahren zur Analyse und Detektion von Analyten zu schaffen, welches eine zuverlässige Interpretation der Ergebnisse nach definierten Kriterien und eine quantitative Aussage ermöglicht.

- 30 Zur Lösung dieser Aufgabe schlägt die Erfindung ein Verfahren mit den im Anspruch 1 genannten Merkmalen vor. Weiterbildungen der Erfindung sind Gegenstand von

Unteransprüchen, deren Wortlaut ebenso wie der Wortlaut der Zusammenfassung durch Bezugnahme zum Inhalt der Beschreibung gemacht wird.

Das oben genannte Ziel wird gemäß der Erfindung durch ein Verfahren erreicht, bei dem eine molekulare Interaktion an einer bestimmten Stelle des Trägers zur Erzeugung von

5 detektierbaren Strukturen führt, hier als signalgebende Elemente bezeichnet, die im Kontext des in Form eines digitalen Datencodes definierten Formats auf dem Analysenträger gelesen und interpretiert werden können.

Auf dem Analysenträger sind Nachweisfelder mit den für den jeweiligen Nachweis benötigten Sensorelementen sowie weitere Datenstrukturen in einem digitalen Format  
10 aufgebracht und zu Abfolgen von Formatstrukturen zusammengefaßt, welche zweifelsfrei als Codewörter interpretiert werden können. Zum Nachweis und zur Quantifizierung eines Analyten in einer Probe wird diese auf den Analysenträger appliziert und eine Wandlung des digitalen Signalpegels auf den jeweiligen Nachweisfeldern mit Hilfe eines signalgebenden Elements initiiert. Dadurch wird ein Codewort gegen ein anderes, innerhalb der Menge von  
15 gültigen Codewörtern erlaubtes Codewort ausgetauscht. Die Aussage über eine erfolgte oder nicht erfolgte Reaktion basiert auf einem Vergleich der jeweiligen Formatstrukturen vor und nach dem Nachweis. Die Ausführungsbeispiele sind eine CD, eine Magnetkarte, eine optische Karte und eine Barcode-Karte.

Das erfindungsgemäße Verfahren besitzt gegenüber bekannten Methoden den Vorteil, daß  
20 durch die digitale Datengewinnung eine aufwändige zweidimensionale Bildanalyse überflüssig wird. Durch die Schaffung einer digitalen Informationsstruktur entfällt die komplizierte und fehleranfällige Analogsignalverarbeitung. Eine zuverlässige Interpretation der Ergebnisse nach definierten Kriterien wird ermöglicht. Ferner lassen sich der Analysenträger und das Lesegerät, das aus gängigen Komponenten aus der  
25 Konsumgüterindustrie aufgebaut ist, abhängig von der Fragestellung leicht aufeinander abstimmen, so daß unterschiedliche Tests schnell und preiswert in einer Massenproduktion entwickelt und hergestellt werden können.

Weitere Vorteile, Merkmale und Anwendungsmöglichkeiten der Erfindung werden nachstehend anhand der detaillierten Beschreibung und Ausführungsbeispiele mit Bezug auf  
30 die Zeichnungen geschildert. In den Zeichnungen zeigen:

**Fig. 1:** A) Schematische Darstellung einer beispielhaften Abfolge von Formatelementen auf einem Analysenträger, die aus Leerfeldern 5, Adressfeldern 6 (graue Vierecke) und Nachweisfeldern 7 (weiße Vierecke) besteht und eine Spur bildet. Der Einlaufbereich 8 dient dazu, die Spur beim Lesen zu suchen und anzulaufen; B) Vor dem Nachweis repräsentiert die Abfolge von Formatelementen das Codewort A; C) Nach dem erfolgten Nachweis kann die dargestellte Abfolge von Formatelementen das Wort A, wenn keine Reaktion stattfand (I.), oder das Codewort B, im Falle einer Reaktion (II.), repräsentieren. Die binären Codewörter A und B unterscheiden sich durch einen Austausch eines Signalpegels in der vierten Position, die einem Nachweisfeld entspricht.

**Fig. 2:** A) In einer schematischen Darstellung die einfachste Ausführungsform des Analysenträgers 1 mit einer exemplarisch linear skizzierten Spur 2 von Formatelementen und einem Einlaufbereich 8; B) In einer schematischen Darstellung eine weitere Gestaltungsmöglichkeit des Analysenträgers 1 mit einer Spur 2 von Formatelementen und einem Einlaufbereich 8, einem optionalen Mittelloch 3 für die Kombination von Analysenträger und CD samt spiralförmiger Datenspur 4 für die Datenspeicherung und Software; C) In einer schematischen Darstellung ein Beispiel einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des Analysenträgers 1 mit einem Mittelloch 3, einer spiralförmigen Datenspur 4 im CD-R Standard für die Datenspeicherung und Software, und einer spiralförmigen Spur 32 von Formatelementen im CD-R Standard; D) In einer schematischen Darstellung eine weitere Gestaltungsmöglichkeit des Analysenträgers in Form einer CD 33 mit einem Mittelloch 3, spiralförmiger Datenspur 4 im CD-R Standard für die Datenspeicherung und Software, und einer spiralförmigen Spur 32 von Formatelementen im CD-Standard.

**Fig. 3:** Schematische Darstellung eines Analysenträgers 1 mit mehreren parallel angeordneten Spuren, die aus Reihen von Nachweis-, Informations- und Leerfeldern bestehen. Eine beispielhafte Befüllung des Analysenträgers 1 mittels einer Mikrofluidik-Platte 9 mit Sensorelementen oder Analytlösungen durch in den Träger eingebettete oder anderweitig räumlich arrangierte Mikrokanäle 10 ist dargestellt.

**Fig. 4:** Schematische Darstellung eines Nachweises nach Beispiel 1. Eine Bindungsreaktion zwischen einem auf dem Analysenträger 1 aufgebrauchten Sensorelement 34, hier ein Antikörper, und einem Analytmolekül 12, hier ein Protein, aus der Probe ist dargestellt. Der Nachweis erfolgt in einem Sandwich-Immunoassay mit Hilfe eines zweiten Antikörpers 11, der gegen ein anderes Epitop des Proteins gerichtet ist. Ein am zweiten Antikörper gekoppeltes Kolloidgoldpartikel 13 führt zur Abscheidung eines Silberkörnchens 14, das als signalgebendes Element dient.

**Fig. 5:** Schematische Darstellung eines Nachweises nach Beispiel 3. Eine Bindungsreaktion zwischen einem auf dem Träger 1 aufgebrauchten Rezeptor 15 und einem Liganden 16 aus der Probe, welcher an ein Hapten 17, hier Biotin, gekoppelt ist. Nach Zugabe einer Mischung aus Streptavidin 18 und biotinyliertem Ferritin 19 bilden sich signalgebende Elemente in Form von Molekülkomplexen 20.

**Fig. 6:** Signalgebende Elemente am Beispiel von Polystyrol-Beads von 1  $\mu\text{m}$  Durchmesser, die nach zwei unterschiedlichen Verfahren detektiert und binär interpretiert sind. A) Ein von einem CD-Lesekopf aufgenommenes Bild; B) dieselben Beads aufgenommen mit der Fluoreszenzmikroskopie; C) dreidimensionale Darstellung der Daten aus A), die binär interpretiert werden können.

**Fig. 7:** A) Vereinfachte schematische Darstellung eines optischen Systems, das einen gewöhnlichen CD-Lesekopf repräsentiert, für die Detektion des Reflektionssignals, bestehend aus Laser (L) 25, Detektor zur Fokusregelung und Signaldetektion (D/F) 27, Fokussiereinrichtung 28 und teilverspiegelte Platte 29. Der Analysenträger 1 mit Verspiegelung 30 ist in der Seitenansicht im Strahlengang dargestellt; B) Vereinfachte schematische Darstellung eines optischen Systems für die Detektion des Transmissionssignals, bestehend aus einem CD-Pickup des Beispiels A), dem eigentlichen Detektor zur Transmissionsmessung (D) 26 und eventuell einer zusätzlichen Fokussiereinrichtungen 31. Der Analysenträger 1 mit Verspiegelung 30 ist in der Seitenansicht im Strahlengang zwischen den Fokussiereinrichtungen 28 und 31 dargestellt.

**Fig. 8:** Schematische Darstellung eines Analysenträgers, auf dem die Nachweisfelder als parallele Streifen derart aufgebracht sind, daß sie sich mit einem Barcode-Lesegerät auslesen lassen. A) Die einzelnen Nachweisfelder 23 sind in größeren

Nachweisbereichen in Form von Teststreifen 22 angeordnet. Sie können zusammen mit Adressfeldern 21, die z.B. Informationen zu Testspezifikationen, Kodierungen (Dongle) oder Produkt-Identifikation enthalten, in einer Testeinheit untergebracht sein. Nach einer Nachweisreaktion mit Analyten aus verschiedenen Proben 1 und 2  
5 ergeben sich unterschiedliche Muster von signalgebenden Elementen auf den Teststreifen, die mit einem Barcode-Lesegerät ausgelesen werden können; B) Die Teststreifen 22 können aus mehreren Nachweisfeldern 24 bestehen, die zur Hauptleserichtung orthogonal angeordnet sind und beispielsweise Konzentrationsreihen enthalten können.

- 10 **Fig. 9:** Bild von feinen Linien im Mikrometerbereich, denen eine Antikörper-Antigen Reaktion mit nachgeschalteter Silberabscheidung zugrunde liegt. A) Mit einem CD-Lesekopf aufgenommenes Analogbild; B) Analoge Bildzeile aus A), gelesen entlang der waagerechten gestrichelten Linie; C) Digitale Auswertung der Bildzeile aus B), erzeugt aus dem Analogsignal unter Verwendung eines Schwellenkriteriums,  
15 gekennzeichnet durch die waagerechte Linie in B).

## Verfahren für biochemische Nachweise von Analyten

### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung umfaßt die folgenden wesentlichen Komponenten, welche im Zusammenspiel den vorteilhaften Gebrauch des erfindungsgemäßen Verfahrens ausmachen:

- 20 - Ein Analysenträger, bestehend aus einem Basisträger und darauf aufgebrachten Leer-, Informations- und Nachweisfeldern, die in einem digitalen Datencode formatiert sind;
- Sensorelemente, aufgebracht auf ein definiertes Muster der Nachweisfelder;
- Ein Standardprotokoll zur Durchführung von spezifischen Wechselwirkungen zwischen Sensorelementen und Analyten aus der Probe sowie zur Ausbildung von signalgebenden  
25 Elementen auf den Nachweisfeldern;
- Ein Lesegerät zur Detektion von signalgebenden Elementen auf den Nachweisfeldern im Kontext des vorgegebenen digitalen Formats samt Steuerung und Auswertesoftware.

Die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wesentlichen Komponenten werden nachfolgend im Einzelnen erläutert.

### **Codierung**

Der Analysenträger ist mit einem definierten digitalen Datencode formatiert. Das Format ist  
5 durch die Wahl der konkreten technischen Umsetzung und das verwendete Detektionssystem  
oder allgemein das Lesegerät vorgegeben. So wird das Format beispielsweise durch die  
jeweiligen Charakteristika von Pits und Lands in der CD-Technologie, "High"- und "Low"-  
Pegeln in der Digitalelektronik, Ton und Pause beim Morsecode etc., festgelegt. Im Falle der  
aus der CD-Technologie bekannten Detektionssysteme bestimmen z.B. eine definierte  
10 Geometrie, Länge und Anordnung von Pits und Lands auf einer optischen Disk, gemäß dem  
Red-Book-Standard von Philips, das jeweilige Format.

Die Codierung beschreibt das Regelwerk, nach dem die Information ausgewertet wird. Ein  
Code ist die Summe aller gültigen Codewörter, wobei jedes Codewort durch eine eindeutige  
Abfolge der vorgegebenen Formatstrukturen definiert ist. Eine Codierung enthält im  
15 Allgemeinen zusätzliche Vorschriften wie redundante fehlerkorrigierende Informationen, wie  
eine Quersummenbildung oder eine Verschachtelung wie beispielsweise vom Red-Book-  
Standard in der CD-Industrie vorgegeben.

Die gängigsten Formate der Konsumgüterindustrie verwenden einen binären Code.  
Nachfolgend wird dieser Fall als bevorzugte Ausführung in Detail beschrieben. Ein binärer  
20 Code ist durch eine bestimmte Abfolge von "0"- und "1"-Pegeln (oder "High"- und "Low"-  
Pegeln) definierter Länge gegeben. Im Falle der vorliegenden Erfindung besteht der binäre  
Code aus Abfolgen von Formatstrukturen, die durch Formatelemente "Leerfelder" und  
"Informationsfelder" (Fig. 1A) mit bestimmten Signalpegeln und Signallängen definiert sind.  
Informationsfelder können Adressfelder oder Nachweisfelder sein.

25 In einer besonders bevorzugten Ausführung bilden die Abfolgen von Formatelementen auf  
dem Analysenträger eine oder mehrere Spuren. Eine Spur wird in einer bevorzugten  
Ausführungsform in vier verschiedene Teilbereiche unterteilt (Fig. 1A):

1. Einlaufbereich. Hier wird die Spur gesucht und angelaufen (*Tracking*).



2. Leerfelder. Die Unterbrechungen sind essentiell, um die Position des auszulesenden Nachweisfeldes durch Abzählen oder über eine Adressierung zu bestimmen. Die Leerfelder besitzen einen unveränderlichen Pegel ("0" oder "1") und eine variable Länge.
  3. Adressfelder. Sie enthalten eine Struktur- und Positionsinformation, mit der die Zuordnung des durch die molekulare Interaktion erhaltenen Signals zu einer definierten Substanz ermöglicht wird. Die Adressfelder besitzen einen unveränderlichen Pegel ("1" oder "0") und können unterschiedliche Längen haben. Die Adressfelder und die Leerfelder weisen inverse Pegel auf. Besitzen die Leerfelder einen "0"-Pegel, so ist der Pegel des Adressfeldes "1" oder umgekehrt.
  4. Nachweisfelder. Hier sind die Sensorelemente aufgebracht. Die Nachweisfelder sind durch einen veränderlichen Pegel ("0" oder "1") gekennzeichnet und können unterschiedliche Längen aufweisen. Ein Pegelwechsel von "0" nach "1" bzw. von "1" nach "0" auf einem Nachweisfeld zeigt einen erfolgten Nachweis des Analyten an (s. unten).
- Alle denkbaren definierten Anordnungen von Formatelementen in einer oder zwei Dimensionen sind möglich und sind hiermit Bestandteil der Erfindung.
- Eine Grundidee der vorliegenden Erfindung ist es, die signalgebenden Elemente auf den Nachweisfeldern dem vorgegebenen Format anzupassen und das Ergebnis des jeweiligen biochemischen Nachweises aus dem Vergleich zwischen den jeweiligen Abfolgen der Formatstrukturen vor und nach der durchgeführten Analyse zu erhalten.
- Erfindungsgemäß besteht der Wortschatz des Codes aus einer beschränkten Anzahl an Codewörtern mit einer vorgegebenen Länge, die sich aus den Formatelementen "Leerfelder" und "Informationsfelder" mit definierten Pegeln und Längen zusammenstellen. Jedes Wort kann ein oder mehrere Nachweisfelder enthalten. Undefinierte Wörter sind nicht erlaubt und werden von der Interpreter-Software als Fehler erkannt. Eine bestimmte Anzahl von Codewörtern weist vorteilhaft keine Nachweisfelder auf und wird beispielsweise zur Trennung und / oder Adressierung größerer Codeblöcke genutzt. Durch eine Kombination bzw. Aufreihung von Abfolgen von Formatelementen kann die Anzahl der auf einem Träger aufgetragenen Tests auf einfache Weise skaliert werden.
- Zur Bestimmung des Nachweisergebnisses repräsentiert eine definierte Abfolge von Formatelementen zwei erlaubte Codewörter A und B, die sich durch die Änderung des Pegels

von "0" nach "1" oder von "1" nach "0" auf mindestens einem Nachweisfeld unterscheiden (Fig. 1B). Vor dem Nachweis sind die Pegel auf den Nachweisfeldern derart, daß die Abfolge von Formatelementen z.B. das Codewort A repräsentiert. Durch eine Nachweisreaktion erfolgt ein Austausch von "0" gegen "1", oder umgekehrt. Dadurch wird das Codewort A in  
5 das Codewort B umgewandelt. Wenn keine Reaktion auf den Nachweisfeldern stattfindet, repräsentiert die jeweilige Abfolge von Formatelementen weiterhin das Codewort A (Fig. 1C). Die Interpretation des Ergebnisses erfolgt durch einen Vergleich zwischen den jeweiligen Abfolgen von Formatstrukturen vor und nach der Analyse.

Am Beispiel des Morsecodes soll eine Nachweisauswertung auf einem erfindungsgemäßen  
10 Analysenträger erläutert werden. Der Morsecode sei auf dem Analyseträger durch eine vorgegebene Abfolge von "Low"- und "High"-Pegeln implementiert. Angenommen, der "Low"-Pegel hat immer die Länge 1 und ist durch das Symbol "0" dargestellt. Er dient in diesem Beispiel nur als Trennzeichen. Der "High"-Pegel hat dagegen wahlweise die Länge 1 oder 3 und wird demzufolge durch "1" oder "111" repräsentiert. Angenommen, das  
15 Codewort A ist durch die Abfolge "1 0 1 1 1 0 1" und das Codewort B durch die Abfolge "1 0 1 0 1 0 1" definiert (Fig. 1B). Beide Wörter besitzen die gleiche Gesamtlänge 7, aber der Pegel in der vierten Position, die hier einem Nachweisfeld auf dem Analysenträger entsprechen soll, ist unterschiedlich. Eine Bindungsreaktion auf dem Nachweisfeld in der vierten Position schaltet den "1"-Pegel an dieser Stelle in einen "0"-Pegel um. Dadurch wird  
20 das erlaubte Wort A in das erlaubte Wort B umgewandelt (Fig. 1C). Das Nachweisergebnis resultiert aus dem einfachen Vergleich zwischen dem vor dem Nachweis gegebenen Ausgangswort A und dem nach dem Nachweis gelesenen Wort. Wenn keine Reaktion stattfand, wird das Wort A gelesen ("Test negativ"), im Falle einer erfolgten Reaktion wird das Wort B gelesen ("Test positiv"). Ein anderes Codewort C oder ein undefiniertes Wort  
25 würde im Rahmen der Interpretation erkannt und als Fehler identifiziert. Diese Eigenschaft des Verfahrens kann vorteilhaft als Qualitätskontrolle verwendet werden.

Diese indirekte, auf einer Codierung beruhende sequentielle binäre Datengewinnung besitzt gegenüber den bekannten Verfahren wesentliche Vorteile. Erstens wird eine aufwändige zweidimensionale Bildanalyse vermieden. Zweitens wird durch die Wahl eines binären  
30 Codes eine digitale Informationsstruktur festgelegt, womit eine komplizierte und fehleranfällige Analogsignalverarbeitung entfällt. Drittens ist durch eine Codierung binärer Signale eine Fehlereerkennung und -korrektur möglich. Viertens können zur Detektion und Auswertung Standardbaugruppen oder ganze Geräte aus der Konsumgüterindustrie

verwendet werden.

Auf dem erfindungsgemäßen Analysenträger wird bevorzugt ein Format verwendet, welches in der Konsumgüterindustrie üblich ist. Dieses kann beispielsweise Audio-CD, Optical Disc, CD-R, CD-RW oder MO (ECMA 154, ISO/IEC 10090), CD-ROM (ECMA 130, ISO/IEC 10149), DVD-R (ECMA 268, ISO/IEC 16449) oder nachfolgende Standards sein.

Die Erfindung ist nicht auf Formate beschränkt, die einen binären Code verwenden. Auch andere, auf digitalen Codesystemen basierende Formate sind denkbar und sind somit Bestandteil der Erfindung.

Mehrdimensionale Codes, wie z.B. zweidimensionale Barcodes, sind eine direkte Erweiterung und damit Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Die Anwendung derartiger Codierungen für biochemische Nachweise können von Vorteil sein, da sie eine parallele Datenverarbeitung, Fehlerkorrekturen und eine Gewinnung von redundanten Informationen ermöglichen. In diesem Fall ist eine parallele Datenerfassung, z. B. mittels einer Kamera oder CCD-Chips, von Vorteil, weil damit die Absolutpositionen einmalig bestimmt und angesprochen werden können. Dies steht im Gegensatz zu einem seriellen Auslesen, bei dem eine Positionsbestimmung anhand von Marken, Adressen oder einer Synchronisierung erfolgen muß.

## Analysenträger

Der Analysenträger kann eine eckige, runde, ovale oder sonstige zwei oder dreidimensionale Form haben. In einer besonders bevorzugten Ausführung der Erfindung wird als Träger ein Substrat verwendet, welches in der Geometrie und der Handhabung der üblichen

- 5 Magnetkarte ähnlich ist (Fig. 2A). Magnet- und Chipkarten haben durch ihre praktische Größe und eine einfache Handhabung weite Verbreitung gefunden. Die wesentlichen Eigenschaften sind ihre Robustheit und die Möglichkeit, eine begrenzte Menge Informationen auf kleinem Raum unterzubringen. In einer verbreiteten Variante beinhaltet die Magnetkarte einen linear angeordneten Datenstreifen mit einem konstanten Abstand zu
- 10 einer ihrer Außenkanten. In Kombination mit dem einfachen Lesegerät resultiert daraus eine einfache mechanische Handhabung - die Karte kann sogar von Hand durch ein Lesegerät gezogen werden. Weil Magnetkarten in großer Stückzahl billig hergestellt werden und die Lesegeräte einfach in der Fertigung sind, gestattet diese Ausführung der Erfindung den Bau von Lesegeräten, die in der Produktion um Größenordnungen preiswerter und in der
- 15 Bedienung einfacher sind als bekannte Apparate zum Nachweis von biologischen Analyten.

- Ferner können als Analysenträger auch magnetische Speicherträger, optische Karten, eine Barcode-Karte (Fig. 8) oder Kombinationen von diesen verwendet werden. Erfindungsgemäß ist die äußere Formgebung nicht auf die üblichen Kartenstandards eingeschränkt. Eine klassische CD (Fig. 2D) und ihre Derivate, z.B. CD-R, DVD, können ebenfalls als
- 20 Analysenträger verwendet werden. Eine vorhandene Formatierung der Formatstrukturen auf dem Analysenträger kann mit Vorteil genutzt werden, womit eine umständliche und teure Umprogrammierung entfällt.

- Das Nachweisareal kann Teil des Trägers oder auf einem separaten Zusatzträger aufbracht sein. Neben den Sensorelementen können auf dem gleichen Träger Software, Datenbanken,
- 25 Signaturen und sonstige Informationen wie z.B. Testspezifikationen, Protokolle zur Durchführung des jeweiligen Tests, etc. in beliebiger Zusammenstellung untergebracht sein. Beliebige Kombination von konventionellen Datenspeichern wie Magnetstreifen, Kartenchips, Barcodes, CD (Fig. 2B, 2C und 2D), CD-ROM, Audio-CD oder CD-R können in den Träger integriert sein.
- 30 Wenn die Abfolgen von Formatelementen auf dem Analysenträger eine oder mehrere Spuren bilden und die Nachweis-, Informations- und die Leerfelder äquivalent dimensioniert sind

und eine Fläche von je  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  aufweisen, so kommt man im oben beschriebenen Beispiel des Morsecodes auf eine Länge von  $35 \mu\text{m}$  für eine Testeinheit. Wenn mehrere solche Testeinheiten hintereinander angeordnet sind, bilden sie eine Spur (Fig. 1A). Bei einer angenommenen Spurlänge von 6 cm erreicht man eine Einzelanalysenzahl von bis zu 2000 in einer Spur. Es ist damit möglich, entweder bis zu 2000 unterschiedliche Tests auf einem Analysenträger durchzuführen, oder unter Verwendung von Konzentrationsreihen eine breite Statistik zu einigen wenigen Nachweisen zu erhalten.

Mehrere parallel angeordneter Spuren von Nachweis-, Informations- und Leerfeldern pro Träger sind möglich (Fig. 3). Diese Anordnung hat mit Vorteil eine Erhöhung der Einzeltestzahl sowie eine Parallelisierung der Testdurchführung und des Auslesens der Ergebnisse zur Folge. Ferner kann beispielsweise die Befüllung einzelner Nachweifelder mit Sensorelementen und / oder einer Probe über eine Mikrofluidik-Platte parallelisiert werden.

Selbstverständlich sind auch lineare, kurvenförmige, radiale, spiral- und kreisförmige oder sonstige geometrische oder auch stochastische Anordnungen von Nachweis-, Informations- und Leerfeldern möglich und hiermit ein Bestandteil der Erfindung.

Als Träger-Material können Polymerkunststoffe mit verschiedenen, der analytischen Aufgabenstellung angepaßten physiko-chemischen Eigenschaften, aber auch Glas, Halbleiter, Metalle, Metallegierungen, Keramiken, Hybridmaterialien oder Kombinationen aus diesen Werkstoffen eingesetzt werden. In einer besonders vorteilhaften Ausführung in Verbindung mit optischen Ausleseverfahren werden Träger aus Glas, transparenten Kunststoffen oder Polymermaterialien, insbesondere auch Polycarbonat optischer Qualität, wie es in der CD- und DVD-Industrie Anwendung findet, verwendet.

Zur Herstellung eines Analysenträgers wird auf den Basisträger zuerst eine Grundformatierung aufgebracht. Für jeden spezifischen Test werden dann in einem vordefinierten Muster auf die als Nachweifelder vorgesehenen Formatelemente die für den jeweiligen Nachweis notwendigen Sensorelemente aufgetragen.

### *Sensorelemente*

Als Sensorelemente können alle Substanzen dienen, die für einen biochemischen oder medizinischen Nachweis von Nutzen sein können. Dies sind unter anderem Zucker, Steroide, Hormone, Lipide, Proteine, insbesondere mono- oder polyklonale oder rekombinante

Antikörper, Peptide, Antigene aller Art, Haptene, DNA, RNA sowie natürliche und  
artifizielle Derivate hiervon, insbesondere Aptamere und PNA, aber auch organisch-  
chemische Wirkstoff-Bibliotheken, wie sie z.B. bei der pharmakologischen Forschung und  
Entwicklung eingesetzt werden. Gleichmaßen können Zellen, Mikroorganismen, Viren  
5 oder Teile davon, Membranfragmente, Präparationen und Extrakte aus biologischen  
Materialien, Stoffwechselmetabolite und dergleichen als Sensorelemente verwendet werden.  
Weitere, dem Fachmann bekannte chemische, biologische, organische oder anorganische  
Elemente mit Sensorcharakter können gleichermaßen Verwendung finden und sind damit  
Bestandteil der Erfindung.

- 10 Die Erfindung sieht vor, daß man mit Vorteil eine Vielzahl von verschiedenen  
Sensorelementen auf einer Substratoberfläche aufbringen kann. Die Sensorelemente einer  
Sorte sind dabei räumlich begrenzt jeweils auf definierte Nachweisfelder aufgebracht. Die  
Ausdehnung der Nachweisfelder kann in einer oder zwei Dimensionen kleiner als 10  $\mu\text{m}$ , mit  
Vorteil kleiner als 2  $\mu\text{m}$  und mit besonderem Vorteil kleiner als 1  $\mu\text{m}$  sein. Neben den  
15 Sensorelementen können entsprechend einer vordefinierten Anordnung weitere Moleküle  
oder signalgebende Elemente auf benachbarten Nachweisfeldern aufgebracht sein, welche  
zur Kalibrierung oder Standardisierung der Analysen dienen.

- Nach Stand der Technik sind dem Fachmann Lösungen bekannt, um die Sensorelemente an  
die Träger-Oberfläche zu binden, ohne ihre Funktionalität nachteilig zu beeinflussen. Die  
20 Sensorelemente können kovalent oder nichtkovalent mit der Träger-Oberfläche verbunden  
oder auf der Träger-Oberfläche aufgetragen sein. Das Aufbringen der Sensorelemente auf  
den Analysenträger kann mechanisch insbesondere durch eine Tropfenapplikation z.B. mit  
Hilfe von Tintenstrahldruckern (*Ink-Jet Printing*) oder Drucknadeln (*Spotting*), oder mittels  
lithographischer Methoden nach Stand der Technik geschehen. Das Benetzen der  
25 Nachweisfelder mit den Sensorelementen kann auch mittels Kanälen, bevorzugt Mikrokanälen  
oder mikrofluidischer Netzwerke (Fig. 3) erfolgen. Auch ein einfaches Eintauchen des  
Analysenträgers in ein die Sensorelemente enthaltendes Flüssigkeitsbad nach selektiver  
Aktivierung von Nachweisfeldern bzw. einer Passivierung von Leerfeldern auf einem flächig  
aktivierten Träger ist möglich. Ein Spin-Coating Verfahren kann ebenfalls verwendet  
30 werden, um beispielsweise eine flächige Aktivierung der Oberfläche zu gewährleisten.

In einer anderen vorteilhaften Variante wird für den Analyseträger ein für eine bestimmte Lichtwellenlänge transparentes Material verwendet. Die lichtleitenden Eigenschaften des Trägers können erfindungsgemäß dazu verwendet werden, um über die ortsselektive Lichtleitung bestimmte Moleküle an den vordefinierten Orten anzukoppeln bzw. zu synthetisieren. Ebenso ist eine durch elektrische Felder gesteuerte Synthese direkt auf dem Träger denkbar.

Die kovalente Verknüpfung der Sensorelemente kann beispielsweise über eine Bindung bereits vorhandener oder speziell eingeführter amino-, thio- oder phospho-Gruppen an eine endgruppen-funktionalisierte silanisierte Träger-Oberfläche erreicht werden. Alternativ können biotinylierte Sensorelemente mittels Streptavidin-Beschichtung auf der Träger-Oberfläche spezifisch immobilisiert werden.

### *Signalgebende Elemente*

Ein Grundgedanke der vorliegenden Erfindung ist es, die physikalischen Parameter der signalgebenden Elemente wie Größe, Form und Signalpegel der in Form von Leer- und Adressfeldern aufgetragenen Formatstruktur anzupassen. Dies steht im Gegensatz zur üblichen Vorgehensweise, bei der zum gegebenen Signal eine passende Formatstruktur und Geräte entwickelt werden. Die Rahmenbedingungen wie Positionierung und Dimensionierung der Formatelemente und der signalgebenden Elemente ist durch die Codierung vorgegeben.

Zur Signalgebung können alle resonanten (Absorption, Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Plasmonenresonanz, Quenching etc.) und nichtresonanten (Reflektion, Beugung, Streuung etc.) Prozesse aus der Spektroskopie herangezogen werden. Alternativ können auch elektromagnetische Effekte (Piezo, Resonanzverschiebung, Kapazitätsänderung, Halleffekt, magnetische Effekte, elektrische Ladungsverschiebung etc.) zur Signalerzeugung dienen. Auch chemische Prozesse wie Silberabscheidung, Fällung von Oxiden, Oxidation oder Reduktion von Reagenzien, Elektroplating und dergleichen können für den Nachweis herangezogen werden. Weitere, dem Fachmann bekannte chemische, physikalische oder biologische Signalgeber können gleichermaßen verwendet werden und sind damit Bestandteil der Erfindung.

Als signalgebende Elemente kann eine Reihe von handelsüblichen Substanzen und Körper benutzt werden, die detektierbare Strukturen darstellen oder ausbilden können. Mit Vorteil kann es sich um Mikrosphären (*Beads*) (Fig. 6) in jeglicher Form und Größe wie Metall-, Magneto-, Silica- oder fluoreszenzmarkierte Beads, Fluoreszenz- oder radioaktive Marker, sowie Molekülkomplexe oder -aggregate, Schichten von Präzipitaten oder Farbstoffen handeln.

In einer bevorzugten Ausführungsvariante der optischen Detektion werden Silberkörnchen an einem mit Analytmolekülen gekoppelten Initiator, insbesondere einem Elektronendonator wie Metallmolekül- oder Metallkörnchen, am Ort der Interaktion, meistens einer Bindung, gebildet (Fig. 4). Bei einer weiteren bevorzugten Variante der optischen Detektion werden in einer Reaktion zwischen zwei oder mehr unterschiedlichen Bindungspartnern, wie beispielsweise einem Avidin oder Streptavidin, und einer weiteren mehrfach biotinylierten Substanz Molekülkomplexe gebildet (Fig. 5). Auch biologische Objekte geeigneter Größe wie Zellen, Bakterien, Pollen, Viruspartikel oder Teile davon können vorteilhaft als signalgebende Elemente verwendet werden.

In einer anderen vorteilhaften Ausführung kann die entstehende detektierbare Struktur auch durch Initiation einer chemischen Reaktion mit einer weiteren Substanz erzeugt werden.

Dazu wird zusätzlich zum Sensorelement, welches mit der zu analysierenden Probe wechselwirken soll, eine weitere Substanz an definierten Stellen des Trägers aufgebracht.

Diese Substanz wird durch die Wechselwirkung zwischen einem Analyten und dem dazugehörigen Sensorelement in eine detektierbare Struktur am Ort der Reaktion umgesetzt. So kann beispielsweise ein an das Analyt gekoppeltes Enzym wie Meerrettich Peroxidase (HRP) durch die Bindung des Analyten an das entsprechende Sensorelement eine enzymatische Umsetzung des auf dem Träger lokalisierten Substrats in ein signalgebendes Element initiieren. Die Reaktion wird entweder durch eine räumliche Annäherung zwischen Enzym und Substrat oder durch eine Freisetzung des Substrats in die Lösung während der Wechselwirkung zwischen dem Sensorelement und dem Analyten oder unmittelbar danach ermöglicht.

Die Eigenschaften der nach einer Wechselwirkung zwischen einem Sensorelement und einem Analyten entstehenden detektierbaren Strukturen in Form von signalgebenden Elementen und die daraus resultierenden Signalpegel entsprechen dem auf dem Träger vorgegebenen



digitalen Datenformat. Die Dimensionierung dieser Strukturen kann über verschiedene, dem Fachmann bekannte Methoden erfolgen. So kann beispielsweise über die stöchiometrischen Verhältnisse der eingesetzten Konzentrationen von Substanzen eine Sättigung bei der Bildung von signalgebenden Elementen erzielt werden, so daß nach dem Erreichen einer gewünschten Größe kein weiteres effektives Wachsen des signalgebenden Elements erfolgt. Alternativ können die zur Bildung von detektierbaren Strukturen führenden Reaktionen zeitgesteuert blockiert werden. Dazu können insbesondere Blockierungs-Substanzen wie Inhibitoren bei enzymatischen Reaktionen, Kompetitoren wie Biotin im Beispiel der Fig. 5, oder Substanzen, die freie Reaktanden zerstören wie beispielsweise spezifische Proteasen, eingesetzt werden. In einer besonders bevorzugten Ausführung erfolgen die Nachweisreaktionen in einem Durchflußsystem, so daß die beteiligten Reaktanden nach einer experimentell ermittelten optimalen Reaktionszeit, die für die Ausbildung detektierbarer Strukturen mit gewünschten Dimensionen notwendig ist, mit einem Puffer von den Reaktionsorten ausgespült werden können. Wenn es sich um katalytische Reaktionen handelt, können sie auch durch die Wegnahme oder Blockierung des Katalysators gestoppt werden. Bei lichtabhängigen Reaktionen führt ein Ausschalten der Lichtquelle ebenfalls zum kontrollierten Abbruch der Reaktion.

Vorteilhaft werden Nachweisfelder und signalgebende Elemente mit Abmessungen kleiner als  $10\mu\text{m}$ , insbesondere kleiner als  $2\mu\text{m}$  und ganz besonders kleiner als  $1\mu\text{m}$  ausgebildet.

Eine Beschränkung der Miniaturisierung nach unten ist lediglich durch die Auflösung der Detektionseinheit gegeben.

Durch die Festlegung der Reaktionsbedingungen und die Wahl der Reaktanden entstehen bei einer Wechselwirkung zwischen einem Sensorelement und einem Analyten detektierbare Strukturen, die in dem auf dem Träger vorher aufgetragenen Datenformat gelesen und digital interpretiert werden können. Auf diese Weise läßt sich das Ergebnis direkt als "Test positiv" oder "Test negativ" interpretieren, indem die Signale vor und nach dem Nachweis im Kontext der vorgegebenen Formatierung miteinander verglichen werden.

Eine molekulare Interaktion kann sowohl zur Generierung eines Zusatzsignals als auch zur Reduzierung des Signalpegels durch das signalgebende Element führen. Das geeignete Kontrastverfahren, d.h. die Veränderung des Signalpegels durch das signalgebende Element,

muß dabei in Abhängigkeit vom Standardprotokoll für den jeweiligen biochemischen Test, dem Meßverfahren und vom Analysenträger ausgewählt werden.

Ein erfolgter Nachweis des Analyten wird durch eine veränderte Signalstruktur, d.h. eine Signalpegeländerung von "Low" nach "High" oder von "High" nach "Low", und ein  
5 nichterfolgter Nachweis des Analyten durch ein unverändertes Signal gekennzeichnet. Anhand von nachfolgend beschriebenen Beispielen seien die vier möglichen Kontrastmechanismen für die bevorzugte Variante der optischen Detektion mittels Reflektions- und Transmissionsmessungen exemplarisch dargelegt.

- 10 1. "Low"- "High"-Übergang bei einer Reflektionsmessung. Dieser Fall liegt z.B. bei einer schwachreflektierenden Analysenträger-Oberfläche und einem spiegelnden signalgebenden Element vor. Ein solcher Kontrast kann beispielsweise mittels einer schwarzen Fläche ("Low"-Pegel) und einer durch den positiven Test induzierten Silberfällung als signalgebendes Element ("High"-Pegel) realisiert werden. Ein ähnliches Prinzip wird bei der Schwarz-Weiß-Photographie verwendet.
- 15 2. "High"- "Low"-Übergang bei einer Reflektionsmessung. Hier kann beispielsweise eine Bindung oder Erzeugung eines Streukörpers ("Low") als signalgebendes Element auf einer verspiegelten Träger-Oberfläche ("High") durch einen erfolgten Nachweis ausgelöst werden. Ein solcher Streukörper kann z.B. ein Bead oder ein Silberkörnchen sein.
- 20 3. "Low"- "High"-Übergang bei einer Transmissionsmessung. Dieser Fall liegt z.B. bei einem verspiegelten Analysenträger und einem signalgebenden Element in Form eines Fensters vor. Das Fenster ("High") kann mittels einer lokalen, durch eine molekulare Interaktion mit dem Analyten induzierten Ätzung und damit verbundenen Auflösung der Spiegelschicht ("Low") auf den Nachweisfeldern erzeugt werden. Diese Methode ist vergleichbar mit den typischen lithographischen Ätzverfahren in der Halbleiterphysik.
- 25 4. "High"- "Low"-Übergang bei einer Transmissionsmessung. Dieser Fall liegt z.B. bei einem unverspiegelten und transparenten Analysenträger und einem spiegelnden oder streuenden signalgebenden Element vor. Realisiert werden kann ein solcher Kontrast z.B. anhand einer unbeschichteten Glasplatte ("High") mittels einer Silberfällung als signalgebendes Element ("Low"), ähnlich der Schwarz-Weiß-Photographie. Das Licht  
30 wird durch die Silberkörnchen gestreut und das Transmissionssignal dadurch gedämpft.

Eine weitere Möglichkeit für ein signalgebendes Element stellt ein lichtstreuendes Bead dar.

Quantitative Aussagen können erfindungsgemäß durch Mehrfachbestimmungen und / oder durch Konzentrationsreihen der Sensorelemente und / oder Analyten und nachfolgende

5 Statistik gewonnen werden.

### *Lesegerät*

Weiterhin umfaßt die Erfindung ein für den jeweiligen Analysenträger optimiertes Lesegerät, welches in vorteilhafter Ausführung ein halbautomatisches bzw. automatisches Positionieren, Durchführen und Auslesen des Trägers gestatten. Der Träger kann auch automatisch

10 abgetastet werden.

Als Lesegerät wird vorzugsweise ein bestehendes Produkt aus der Konsumgüterelektronik verwendet oder neue Geräte aus den gängigen Detektions- und Mechanikeinheiten kombiniert. Als Beispiele seien hier die CD-, DVD-, Magnetkarten- und Barcode-Leser genannt.

15 In einer bevorzugten Ausführung entspricht das Lesegerät in seiner Mechanik und Handhabung im Wesentlichen einem manuellen Magnetkartenleser. Das Lesegerät wird dabei entweder mechanisch fest installiert und der Analysenträger wird durchgezogen, oder der Analysenträger wird fest eingelegt und das Lesegerät wird linear unter Verwendung einer entsprechenden Mechanik über den Träger geführt.

20 In vorteilhafter Ausführung der Erfindung basiert das Lesegerät auf optischer Detektion. Das Lesegerät besteht im Wesentlichen aus einer ein- oder beidseitigen „Lichtschranke“. Entsprechend der Signalart wird zur Detektion ein geeigneter Lesekopf verwendet. Das optische Lesegerät kann beispielhaft, aber nicht ausschließlich, die im Folgenden beschriebenen Ausführungsformen haben.

25 In einer besonders bevorzugten Ausführung wird ein kommerziell erhältlicher CD-Lesekopf verwendet, der mit Reflektion arbeitet (Fig. 7A). Alternativ verwendet man einen abgewandelten CD-Lesekopf, der im Gegensatz zu der im CD-Player verwendeten Ausleseseinheit zusätzlich auch mit Durchlicht oder alternativ nur mit Durchlicht arbeitet (Fig. 7B). In diesem Fall kann man auf die bei einer konventionellen CD notwendige

Verspiegelung verzichten, was eine preiswertere Herstellung des Analysenträgers zur Folge hat.

Der Analysenträger kann mit Vorteil in beiden Ausrichtungen orientiert sein, d.h. mit der Vorderseite, also der mit Sensorelementen beschichteten Seite, zum oder weg von der Ausleseeinheit, z.B. einem CD-Lesekopf. Die geeignete Orientierung hängt vom auszuführenden biochemischen Nachweisprotokoll, dem jeweiligen signalgebenden Element, allgemeinen Randbedingungen, wie z.B. einer Verdeckung der Testflächen oder dem Basismaterial des Analysenträgers, und der Detektionsmethode, ab. So ist beispielsweise bei einer Reflektionsmessung die Orientierung einer verspiegelten Vorderseite mit einem lichtstreuenden signalgebenden Element zur optischen Ausleseeinheit von Vorteil, weil in diesem Fall ein streuendes Element auf einer Rückseite nicht erkannt werden würde. Dagegen ist bei einer gekapselten Flüssigkeitsführung mittels Kanalstrukturen auf dem Analyseträger im Fall von spiegelnden signalgebenden Elementen eine Orientierung der Vorderseite weg von der Ausleseeinheit von Vorteil. Anderenfalls müßte das Licht bei einer Reflektionsmessung die Kanalstrukturen durchlaufen, so daß Schmutz- und Störeffekte durch die Lösungen in den Strukturen entstehen könnten.

In einer weiteren bevorzugten Ausführung wird ein konventioneller Barcode-Leser verwendet, wenn die Nachweisfelder auf dem Träger in parallelen Streifen in einem Barcode-ähnlichen Muster angeordnet sind (**Abb. 8A**). In Erweiterung dieser Ausführung kann eine Vielzahl von parallelen Nachweisfeldern mit identischen Substanzen auf einem solchen Teststreifen nebeneinander untergebracht sein. Dabei werden die Testergebnisse winkeltreu, z.B. orthogonal zur Leserichtung des Barcode-Lesers (**Abb. 8B**), ausgelesen. Damit besteht die Möglichkeit zur Mehrfachmessung bei einem durchgeführten Nachweis, um statistische Aussagen zu gewinnen. Alternativ kann ein derart unterteilter Teststreifen Nachweisfelder aufweisen, die unterschiedliche graduell angeordnete Konzentrationen von Sensorelementen enthalten, so daß quantitative Aussagen möglich sind. Auf diese Weise sind auf einem Träger Nachweise in Mikro- und Makrodimensionen in beliebiger Kombination realisierbar.

Die parallelen Spuren von Nachweisfeldern auf einem Analysenträger können vorteilhaft auch mit Multi-Fokus-Optiken, z.B. mit 7 Parallel-Lichtstrahlen, wie sie zum Teil schon in modernen CD-ROM Geräten verwendet werden, parallel ausgelesen werden. Auch die einzelnen Photo-Dioden eines CD-Lesekopfes, welche zur Spurführung dienen, können als Detektor herangezogen werden. Dabei wird ein HF-Filter als Trennsteller eingesetzt, um das

Auslesesignal vom Spurführungssignal zu trennen. Prinzipiell kann die Detektion auch zweidimensional z.B. mit einer Kamera erfolgen. Sie ist im Falle einer flächigen Anordnung der Formatelemente z.B. im Falle des 2D-Barcodes besonders vorteilhaft.

5 Als Detektoren gleichermaßen geeignet wie CD-Leseköpfe sind deren Weiterentwicklungen, wie in CD-ROM-, CD-R- und DVD-Lesern verwendet, sowie magneto-optische und magnetische Detektoren, lineare CCD-Arrays oder Photodioden-Arrays.

10 Die Erfindung ist nicht auf eine optische Datenaufnahme beschränkt. Insbesondere magnetische Detektionsverfahren können wegen einer breiten Anwendung in der Konsumgüterelektronik als Analysenträger dienen. Als Beispiele seien hier Magnetkarten im Bankenwesen sowie Tonbänder und Festplatten in der Computerindustrie genannt. Die dazugehörigen Lesesysteme können nach unwesentlichen Anpassungen an die Geometrie des jeweiligen Analysenträgers als Lesegeräte genutzt werden.

15 Innerhalb des Lesegerätes sorgt ein Lesekopf mittels eines senso-elektrischen Wandlers für die Generierung von Analogsignalen, welche durch Digitalwandlung und nachgeschaltete Mikroprozessor-Logik direkt für die Übertragung in einem Auswertesystem aufbereitet werden können.

20 Die Auswertung des Analyseträgers erfolgt in vier Schritten: a) Messung der analogen Signalpegel z.B. mittels eines CD-Pickups; b) Digitalisierung der analogen Signale, d.h. Erzeugung einer digitalen Signalabfolge anhand eines Schwellenkriteriums; c) Interpretation des digitalen Signalstroms anhand vordefinierter Formatstrukturen; d) Vergleich mit den innerhalb der Formatstruktur erlaubten Signalabfolgen.

25 Die Digitalisierung der analogen Signalpegel erfolgt in einem Standardgerät z.B. in einer elektronischen Baugruppe mit einer Standard AD-Wandlerlogik. Eine Bildverarbeitung entfällt, weil binäre Schwellenwertkriterien durch das Gerät vorgegeben sind (Fig. 9). Die Synchronisation der Datenaufnahme erfolgt automatisch anhand der vorgegebenen Abfolge von Nachweis-, Adress- und Leerfeldern. In weitergehender Ausführung kann vorgesehen sein, mit Hilfe von digitaler Signalverarbeitung (DSP, Mikroprozessor etc.) spezielle Merkmale der signalgebenden Elemente hervorzuheben oder zu unterdrücken, um eindeutige Aussagen zu erhalten. Dies kann z.B. mittels Filterung oder Frequenzanalyse erreicht werden, 30 indem nur Signale mit spezifischen Charakteristika der signalgebenden Elemente und der Formatstrukturen bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Der einlaufende digitale Datenstrom wird in einem Interpreter darauf hin überprüft, ob die zeitliche Abfolge an Signalpegeln innerhalb des vorgegebenen Datenformats zulässig ist. Damit ist eine direkte Kontrolle und Fehlererkennung implementiert. Die zu analysierende Signalabfolge enthält auch die für den Test benötigte Positionsinformation. Eine Interpretation der erhaltenen Signalabfolge erfolgt durch einen Vergleich mit den erlaubten Abfolgen. Eine innerhalb der Codierung zulässige aber nicht erwartete Abfolge weist eindeutig auf einen Fehler hin.

Eine Serie von Einzeltests auf einem Analysenträger läßt sich durch mehrere in Reihen angeordnete Abfolgen von Formatelementen realisieren. Im Falle einer CD sind die Formatelemente samt Nachweisfelder direkt in die Spur der Pits und Lands auf der CD eingebracht. Die Signalpegel, die Signallängen und auch die Interpretation der Signalabfolgen sind hier durch den "Red-book"-Standard der Firma Philips gegeben. Die Auswerteschritte a) bis c) sind in jedem Standard-CD-Player implementiert. Eine Auswertung des Tests erfolgt dann direkt durch einen Vergleich des vorgegebenen Eingangs- mit dem ausgelesenen Ausgangscodewort.

Das nachgeschaltete Rechnersystem benötigt zur Auswertung des auf dem Träger untergebrachten Tests spezielle Software, welche auf den jeweiligen Analysenträger zugeschnitten ist. Diese Software kann in vorteilhafter Ausführung in den auf dem gleichen Träger vorhandenen Datenbereichen aufgebracht sein. Wenn der Analysenträger in Form und Funktion entsprechend ausgebildet ist, können Lesegeräte wie Disketten- oder Wechselplattenlaufwerke, CD-ROM Player oder vergleichbare Geräte und deren Nachfolger, mit denen der Träger prinzipiell kompatibel ist, zum Auslesen der Software verwendet werden. Vorteilhaft können auch mehrere Lesevorrichtungen in einem Gerät vorhanden sein. Die Analysesoftware kann auch optional auf dem Träger vorhandene Datenbanken zugreifen, um Standardwerte, die im Kontext der spezifischen Analyse benötigt werden, im Zugriff zu halten.

### *Anwendungen*

Aufgrund der einfachen Handhabung und der schnellen und präzisen Aussagen über die Nachweisergebnisse kann die vorliegende Erfindung besonders vorteilhaft in biochemischen oder biomedizinischen Nachweisverfahren Anwendung finden. Die Erfindung umfaßt ferner

die für einen Nachweis notwendigen Substanz-Zusammenstellungen ("Kits"). Im Einzelnen seien aufgeführt:

- Krankenhauslabore und Genetik-Beratung zur routinemäßigen Paralleldiagnose von genetischen Prädispositionen;
- 5 - Facharztpraxen zur sensitiven Detektion von Krankheitserregern, Bakterien, Viren, Autoimmun- und Tumorerkrankungen, immunologischen Überreaktionen und Stoffwechselerkrankungen;
- Pharmazeutische Industrie für Hochdurchsatz-Screening auf pharmazeutisch relevante Wirkstoffe und Qualitätskontrolle bei Wirkstoffproduktion;
- 10 - Molekularbiologie in der Grundlagenforschung zur Charakterisierung von Wechselwirkungen in komplexen Molekülgemischen;
- Pflanzengenetik und Hybridentwicklung zur Nutzpflanzenzüchtung für die Agrarwirtschaft, parallele Analyse von Pflanzenmerkmalen wie z.B. Gendaten;
- Umweltanalytik zur Bestimmung von Bodengütefaktoren, Verschmutzungen,  
15 Vorkommen von und Belastung durch Mikroorganismen;
- Tierärztliche Praxis zur gleichzeitigen Durchführung von biochemischen Tests und eindeutigen Identifizierung des Tieres vor Ort mithilfe einer Identifizierungsmarke, z.B. eines implantierbaren, berührungslos durch die Haut auslesbaren Mikrochips, welcher mit einem einfachen transportablen Gerät gelesen werden kann;
- 20 - Point-Of-Care Anwendung zur Durchführung von Diagnoseverfahren vor Ort, also bei einem Facharzt oder ambulant beim Patienten, z.B. für routinemäßig durchzuführende Tests wie Messung von Blutzucker, Blutfetten (LDL/HDL), Bestimmung des Immunstatus etc.;
- Nahrungsmittelindustrie zum Nachweis gentechnisch manipulierter Organismen,  
25 Überwachung von mikrobiologischen oder biochemischen Prozessen und Qualitätskontrolle;
- Agrarwirtschaft zur Entwicklung von Agrochemikalien .

Weitere Möglichkeiten für die Anwendungen der erfindungsgemäßen Analyseplattform sind ebenso möglich und damit Gegenstand der Erfindung.

### *Ausführungsbeispiele*

#### Beispiel 1: Nachweis von C-reaktivem Protein mittels Silberpräzipitat-Bildung

- 5 Ein Träger aus Polycarbonat wird in Ethanol / Wasser (1:2) im Ultraschall gereinigt. Danach wird ein monoklonaler Antikörper (Clone 5 (4C28), HyTest, Finnland) gegen humanes C-reaktives Protein (CRP) mittels eines Stempels aus Polydimethylsiloxan (PDMS) in einem Mikrokontakt-Druck-Verfahren auf definierte Bereiche des Trägers aufgedruckt. Der Stempel und der Träger werden dabei mit Hilfe einer Justiereinheit so zueinander angeordnet, dass
- 10 eine genaue Positionierung von mindestens 5  $\mu\text{m}$  gewährleistet ist. Der Träger wird danach 30 min mit einer Lösung von 1% bovinem Serumalbumin (BSA) geblockt. Nach dem Waschen mit Puffer (PBS, 10 mM Na-Phosphat, 145 mM NaCl, 4 mM KCl, pH 7.4) wird der Trägers 30 min mit einer das CRP-Protein enthaltenden Testprobe inkubiert. Nach dem erneuten Waschen mit PBS wird der Träger 30 min mit einem zweiten, biotinylierten, gegen
- 15 ein anderes Epitop von CRP gerichteten monoklonalen Antikörper (Clone 7 (4C29), HyTest, Finnland; in 1% BSA in PBS, 1:300 der Stocklösung), inkubiert. Zum Nachweis der erfolgten Bindung mittels eines Sandwich-Immunoassays (Fig. 4) wird der Träger 20 min mit einem mit 1nm-Kolloidgoldpartikel konjugierten anti-Biotin Antikörper inkubiert, der 1:400 in 1%BSA in PBS verdünnt ist. Nach dem Waschen wird eine Silberlösung zugegeben.
- 20 Diese besteht in einer vorteilhafter Ausführung aus 110mg Silberlaktat, 850mg Hydroquinon (alternativ: Pyrogallol), 2,55g Zitronensäuremonohydrat, 2,35g Tri-Natriumcitrat ad 100ml Wasser, welche direkt vor der Reaktion frisch angesetzt wird. Um eine gleichmässige Präzipitatbildung zu gewährleisten, können der Silberlösung weitere Zusätze wie z.B. UV-Blocker und Reaktionshemmer wie Gummi Arabicum zugesetzt werden. Nach 2-4 min im
- 25 Dunkeln wird die Reaktion durch Waschen mit destilliertem Wasser gestoppt und anschließend mit 3% (w/v) Natriumthiosulfat in Wasser für 5 min rückentwickelt. Alternativ kann anstelle von Silberlaktat Silberacetat verwendet werden; in diesem Fall findet die Reaktion nicht im Dunkeln, sondern 15 min unter normalem Tageslicht statt. In einer weiteren vorteilhaften Ausführung kann stattdessen eine dem Fachmann aus der
- 30 Immunhistologie bekannte kommerzielle "Silver-Enhancement"-Lösung (z.B. von Sigma-Chemie, München) verwendet werden. Nach erneutem Waschen mit destilliertem Wasser wird der Träger in einem im Wesentlichen handelsüblichen CD-Lesekopf ausgelesen.



Beispiel 2: Nachweis von C-reaktivem Protein mittels alkalischer Phosphatase

Ein Träger wird analog zum Beispiel 1 vorbehandelt und prozessiert. An Stelle des anti-Biotin Antikörpers wird nun aber ein Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat zugegeben (Sigma-Chemie, München; 20 min, in 1%BSA in PBS, 0.5 mg/ml) und danach gewaschen. Zur Signalentwicklung wird der Träger 10 min mit ELF-97 Phosphatase-Substrat (Molecular Probes, 5mM in AP-Puffer: 150 mM NaCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 1% BSA, 100 mM Tris-HCl, pH 9,5) inkubiert und danach gründlich gewaschen. Das durch das Enzym umgewandelte Substrat präzipitiert am Ort der Umwandlung. Alternativ können andere Substrate und auch andere Detektionsenzym-Komplexe angewendet werden, z.B. alkalische Phosphatase mit BCIP/NBT von Sigma-Chemie; Streptavidin-Peroxidase-Konjugat von Roche mit 4-Chloro-1-Naphthol von Sigma-Chemie; Peroxidase mit DAP/Co von Sigma-Chemie).

Beispiel 3: Nachweis von Proteinen über die Bildung von Molekülkomplexen

Biotinylierte Antikörper gegen ein gesuchtes Protein werden mit einer Patienten-Serumprobe, welche vorher 1:3 in PBS (s.o.) verdünnt wurde, gemischt. Die Mischung wird 10 min. bei 13000xg zentrifugiert und der Überstand auf einen Detektionsträger aufgebracht, welcher an bestimmten Stellen in einem Vorgang analog zu dem in Beispiel 1 beschriebenen mit einem weiteren Antikörper beschichtet ist, welcher ein anderes Epitop auf dem aus dem Serum nachzuweisenden Protein bindet. Nach dreißigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und dreifachem Waschen in PBS wird ein in auf 4°C gekühltem PBS frisch angesetztes Gemisch aus core-Streptavidin und biotinyliertem Ferritin auf den Detektionsträger aufgebracht. Das Ferritin wurde dabei mit einem Kit nach Stand der Technik derart biotinyliert, daß durchschnittlich 4-10 Biotin-Moleküle pro Ferritin-Tetramer gebunden sind. Innerhalb einer Inkubationszeit von typischerweise 30 Minuten bilden sich bei einem bestimmten Gehalt des gesuchten Proteins große kreuzvernetzte Komplexe an den Stellen, an denen der Träger mit dem entsprechenden Antikörper beschichtet ist (Fig. 5). Diese Komplexe sind optisch zu detektieren, ihre Anordnung wird im Weiteren analog zu Beispiel 1 ausgelesen und nachgewiesen.

Beispiel 4: Nachweis von DNA Sequenzen über die Bildung von Silberpräzipitaten

Die DNA-Oligonukleotide, die eine endständige Aminogruppe tragen, werden auf aminierten Polycarbonat-Trägern (Aminopropyltriethoxysilane, Fluka) mittels Standardverfahren, z.B. Crosslinker BS3, Pierce, immobilisiert. Die Einzelstrang-DNA dient als Sensormolekül zur Bindung von Zielsequenzen-DNA, die in einer PCR-Reaktion biotinyliert ist. Nach einer Hybridisierung kann die Ziel-DNA mittels Streptavidin-kolloidales Gold und Silberfällungsreaktion sichtbar gemacht und mit Hilfe eines CD-Lesekopfes detektiert werden.

## Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis und / oder zur Quantifizierung von mindestens einem Analyten in einer Probe auf einem Analysenträger, wobei mindestens eine definierte Abfolge von Feldern auf der Oberfläche des Analysenträgers aufgebracht ist, dadurch gekennzeichnet, daß
- 5
- Eine Teilmenge der Felder Nachweisfelder darstellt;
  - Auf jedem Feld ein Signal einer Sorte vorhanden ist;
  - Signale mindestens einer definierten Abfolge von Feldern als digitales Codewort interpretiert werden können;
- 10
- Sensorelemente gezielt auf den Nachweisfeldern aufgebracht sind;
  - Analyten mit dem Analysenträger zum Zweck einer molekularen Interaktion mit den Sensorelementen auf den Nachweisfeldern in Kontakt gebracht werden;
  - Bei einer erfolgten molekularen Interaktion signalgebende Elemente auf den Nachweisfeldern lokalisiert sind;
- 15
- Durch die Lokalisation signalgebender Elemente eine Sorte des Signals auf dem Nachweisfeld, auf dem die molekulare Interaktion stattgefunden hat, gegen eine andere Sorte des Signals in vorgegebener Weise ausgetauscht wird;
  - Nach dem Austausch von einem Signal einer Sorte gegen ein Signal anderer Sorte auf mindestens einem Nachweisfeld innerhalb einer definierten Abfolge von Feldern die
- 20
- Interpretation dieser Abfolge von Feldern ein anderes Codewort ergibt als vor der molekularen Interaktion;
  - Der Vergleich des gelesenen Codewortes nach dem Nachweis mit dem bekannten Codewort vor dem Nachweis das Nachweisergebnis ergibt.
- 25
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Austausch von einem Signal einer Sorte gegen ein Signal anderer Sorte auf einem Nicht-Nachweisfeld

innerhalb einer definierten Abfolge von Feldern bei der Interpretation als ein Fehler erkannt wird.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Signale auf den Feldern in einem aus digitalen Speichertechnologien bekannten Format  
5 gelesen und interpretiert werden können.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die signalgebenden Elemente derart ausgebildet und lokalisiert sind, daß sie in einem aus digitalen Speichertechnologien bekannten Format gelesen und interpretiert werden können.
- 10 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine bestimmte Anzahl von Codewörtern keine Nachweisfelder aufweist und zur Trennung und / oder Adressierung größerer Codeblöcke genutzt wird.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sensorelemente einer Sorte mindestens einem definierten Nachweisfeld auf dem  
15 Analysenträger eindeutig zugeordnet werden können und umgekehrt.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Felder auf dem Analysenträger punktförmig, streifenförmig, kreisförmig, spiralförmig sind oder eine sonstige geometrische Form aufweisen.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  
20 einzelne Felder auf dem Analysenträger in Form einer Punktmatrix, einer kreisförmigen, spiralförmigen, streifenförmigen, linearen oder sonstigen geometrischen oder stochastischen Struktur angeordnet sind.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  
25 Abfolgen von definierten Feldern, die Codewörter representieren, auf dem Analysenträger hintereinander in Form einer Spur angeordnet sind.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Spuren kreisförmig, spiralförmig, linear oder in einer sonstigen definierten Weise auf dem Analysenträger angeordnet sind.
- 5 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Sensorelemente biologisch aktive Substanzen wie Zucker, Steroide, Hormone, Lipide, Proteine, insbesondere mono- oder polyklonale oder rekombinante Antikörper, Peptide, Antigene aller Art, Haptene, DNA, RNA sowie natürliche und artifizielle Derivate hiervon, insbesondere Aptamere und PNA, organisch-chemische Wirkstoff-Bibliotheken, Zellen, Mikroorganismen, Viren oder Teile davon, Präparationen und Extrakte aus  
10 biologischen Materialien, Stoffwechselmetaboliten und dergleichen verwendet werden können.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erzeugung der Signale alle resonanten Prozesse wie Absorption, Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Plasmonenresonanz, Quenching etc., und nichtresonanten Prozesse wie  
15 Reflektion, Beugung, Streuung etc., aus der Spektroskopie verwendet werden können.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erzeugung der Signale elektromagnetische Effekte, wie Piezo, Resonanzverschiebung, Kapazitätsänderung, Halleffekt, magnetische Effekte, elektrische Ladungsverschiebung etc., verwendet werden können.
- 20 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als signalgebende Elemente Mikrosphären in jeglicher Form und Größe wie Metall-, Magneto-, Silica- oder fluoreszenzmarkierte Beads, Fluoreszenz- oder radioaktive Marker, sowie Molekülkomplexe oder -aggregate, Schichten von Präzipitaten, oder Farbstoffen verwendet werden.
- 25 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als signalgebende Elemente biologische Objekte wie Zellen, Bakterien, Pollen, Viruspartikel oder Teile davon verwendet werden können.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als signalgebende Elemente Körper und Beschichtungen, insbesondere Metallkörnchen, an einem mit Analyt-Molekülen gekoppelten Initiator, insbesondere einem Elektronendonator, am Ort der Interaktion gebildet werden.
- 5 17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bildung von signalgebenden Elementen eine Bindungs-, Polymerisations-, Fällungs-, Abscheidungs-, Farb- oder sonstige chemische oder biochemische Reaktionen eingesetzt werden.
- 10 18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Digitalisierung der von den signalgebenden Elementen erzeugten Signale mittels eines Schwellenkriteriums erfolgt.
19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Abmessungen der signalgebenden Elemente an die Dimensionen der Nachweisfelder angepasst werden können.
- 15 20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die signalgebenden Elemente derart ausgebildet sind, daß auf jedem Nachweisfeld genau ein signalgebendes Element lokalisiert ist.
- 20 21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Felder und die signalgebenden Elemente die Abmessungen kleiner als  $10\mu\text{m}$ , bevorzugt kleiner als  $2\mu\text{m}$  und insbesondere kleiner als  $1\mu\text{m}$  aufweisen können.
22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Quantifizierung des Analyten in der Probe anhand von Kalibrierfeldern, definierter Schwellenwertkriterien und / oder einer Statistik über Mehrfachbestimmung erfolgt.
- 25 23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Analysenträger eine Synchronisationsspur mit standardisierten Substanzen,

Oberflächenbeschichtungen oder sonstigen Strukturen zur Kalibrierung des Lesegerätes und der Detektion aufgebracht ist.

24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß auf definierten Nachweisfeldern und / oder auf nebeneinander oder nachfolgend angeordneten Reihen solcher Nachweisfelder Standard-Substanzen zur Positiv- oder Negativkontrollen aufgebracht sind.
25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß auf definierten Nachweisfeldern und/oder auf nebeneinander oder nachfolgend angeordneten Reihen solcher Nachweisfelder unterschiedliche Konzentrationen von Sensorelementen einer Sorte aufgebracht sind.
26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Analysenträger beliebige Kombination von konventionellen Datenspeichern wie Magnetstreifen, Kartenchips, Barcodes, CD-ROM und CD-R integriert sind.
27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Analysenträger Software, Datenbanken, Signaturen und sonstige Informationen in beliebiger Zusammenstellung vorhanden sind.
28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Analysenträger eine Verschlüsselung oder Kennzeichnung des auf dem Analysenträger auszuführenden Nachweises im gleichen oder einem anderen separat aufgebrachten Format vorhanden ist.
29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Felder derart ausgebildet und angeordnet sind, daß sie mittels eines handelsüblichen Barcode-Lesegerätes ausgelesen werden können.
30. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Analysenträger in seinen physikalischen Eigenschaften, wie Form, Material, optische

Dichte, Materialstärke, sowie Handhabung, mit einer aus den Massenspeichertechnologien bekannten Magnetkarte vergleichbar ist.

31. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet , daß der Analysenträger in seinen physikalischen Eigenschaften, wie Form, Material, optische Dichte, Materialstärke, sowie Handhabung, mit einer aus den Massenspeichertechnologien bekannten CD, CD-ROM, DVD, oder deren Abkömmlingen entspricht.
32. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet , daß die Felder auf dem Analysenträger in Form einer spiralg aufgetragenen CD-Datenspur angeordnet sind.
33. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet , daß auf dem Analysenträger eine oder mehr beschreibbare Datenspuren aufgetragen sind.
34. Analysenträger, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eine der in den vorhergehenden Ansprüchen beschriebenen Eigenschaften aufweist.
35. Gerät zum Auslesen des nach dem Anspruch 34 beschriebenen Analysenträgers, gekennzeichnet durch mindestens eines der folgenden Merkmale:
- Einrichtungen für Durchlicht und / oder Auflicht-Detektion;
  - Einrichtungen für magnetische oder elektrische Detektion;
  - Einrichtung zum automatischen Auffinden der Nachweisspuren;
  - Einrichtung zum manuellen, halbautomatischen und automatischen Durchziehen des Analysenträgers durch das Gerät samt geeigneter mechanischer Führung;
  - Einrichtung zur Erfassung von analogen Signalen;
  - Einrichtung zur Digitalisierung der analogen Signale;



- Einrichtung zur zeit- und orts aufgelösten Synchronisation der Erfassung von analogen und / oder digitalen Signalen;
  - Einrichtung zur Fehlerkorrektur beim Auslesen und / oder bei der Interpretation von Signalen.
- 5 36. Kit, enthaltend die wesentlichen Substanzen zur Herstellung eines im Anspruch 34 beschriebenen Analysenträgers.
37. Kit, enthaltend die wesentlichen Substanzen zur Durchführung einer oder mehrerer Nachweise auf einem im Anspruch 34 beschriebenen Analysenträger.

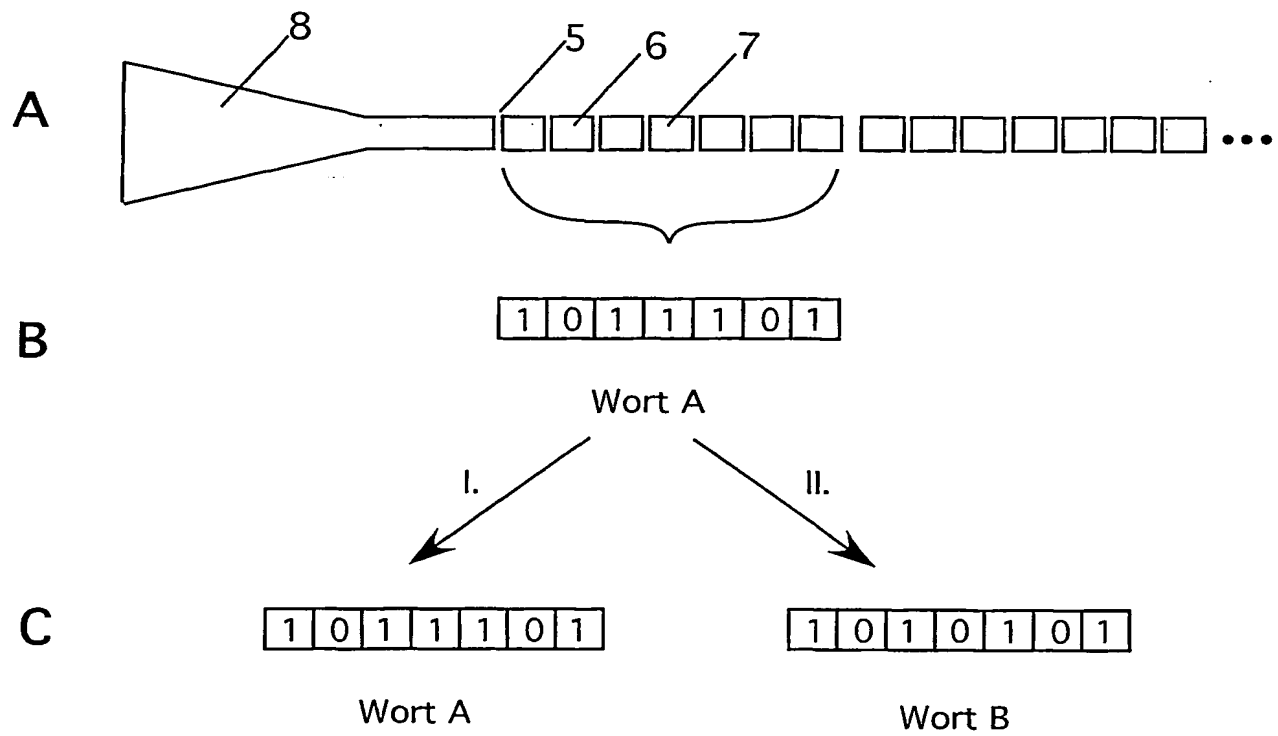


Fig. 1

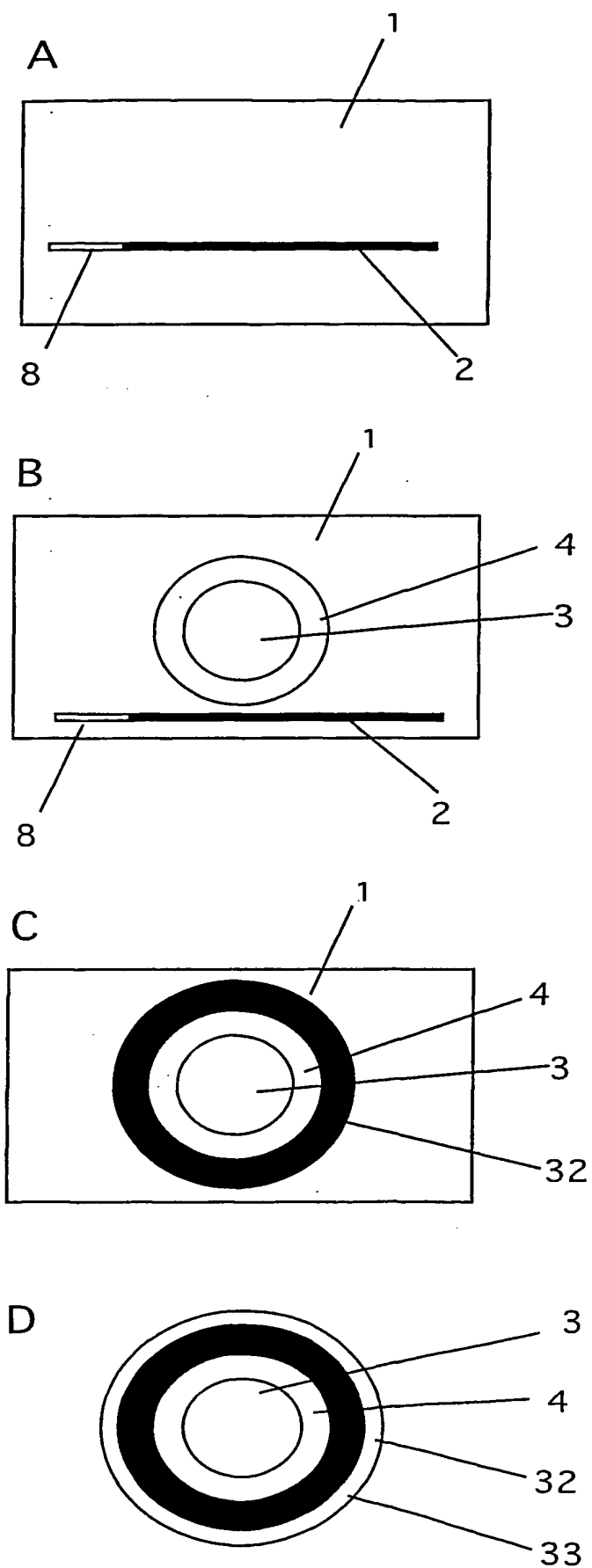


Fig. 2

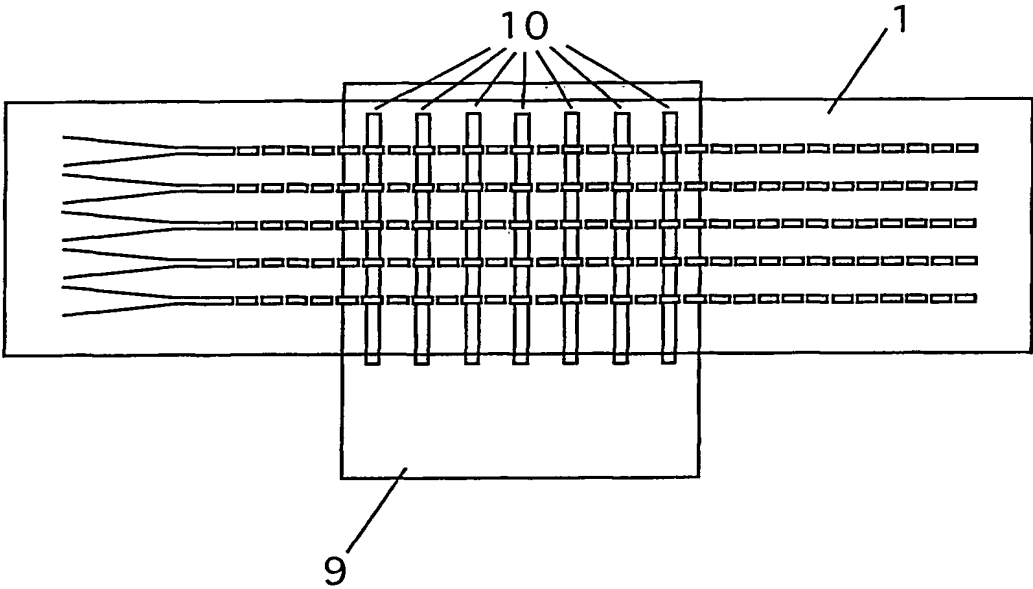


Fig. 3

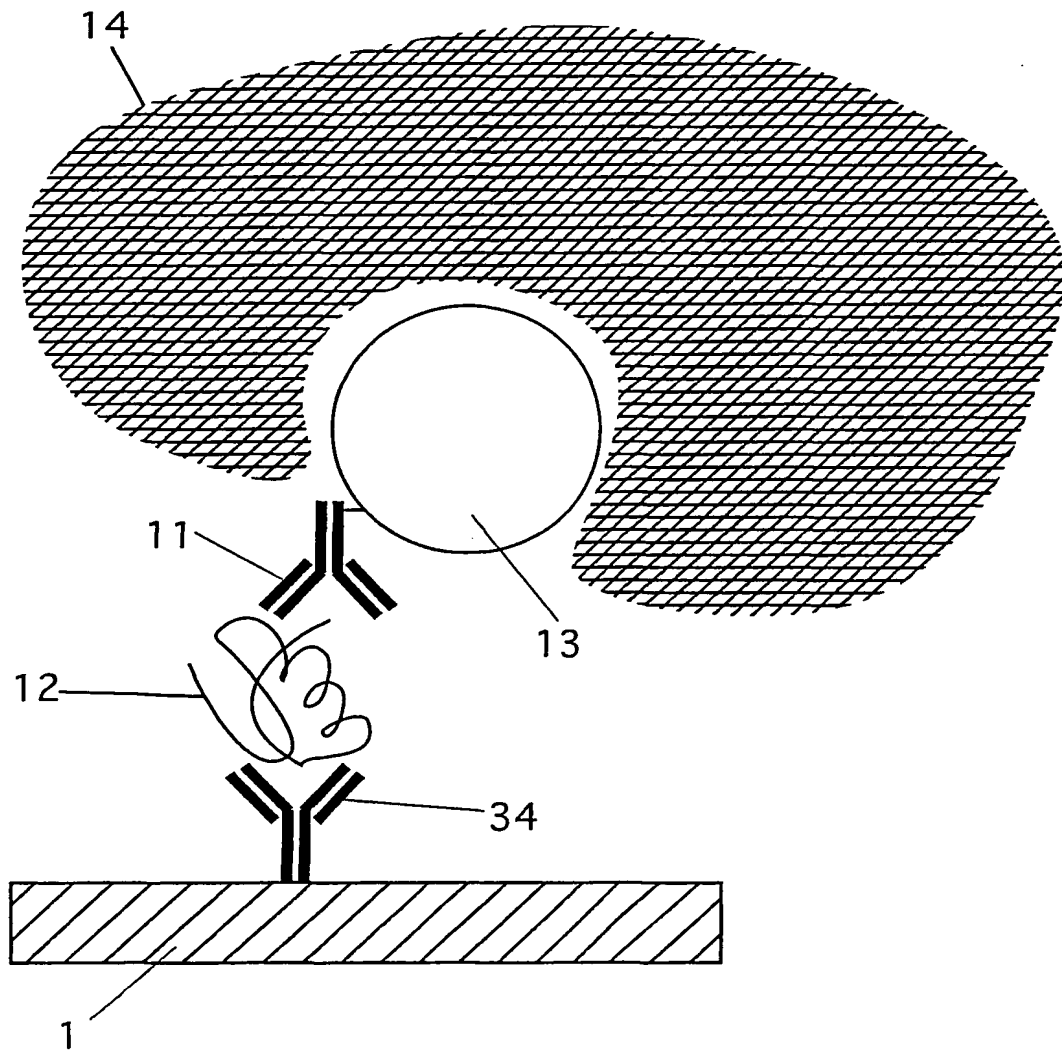


Fig. 4

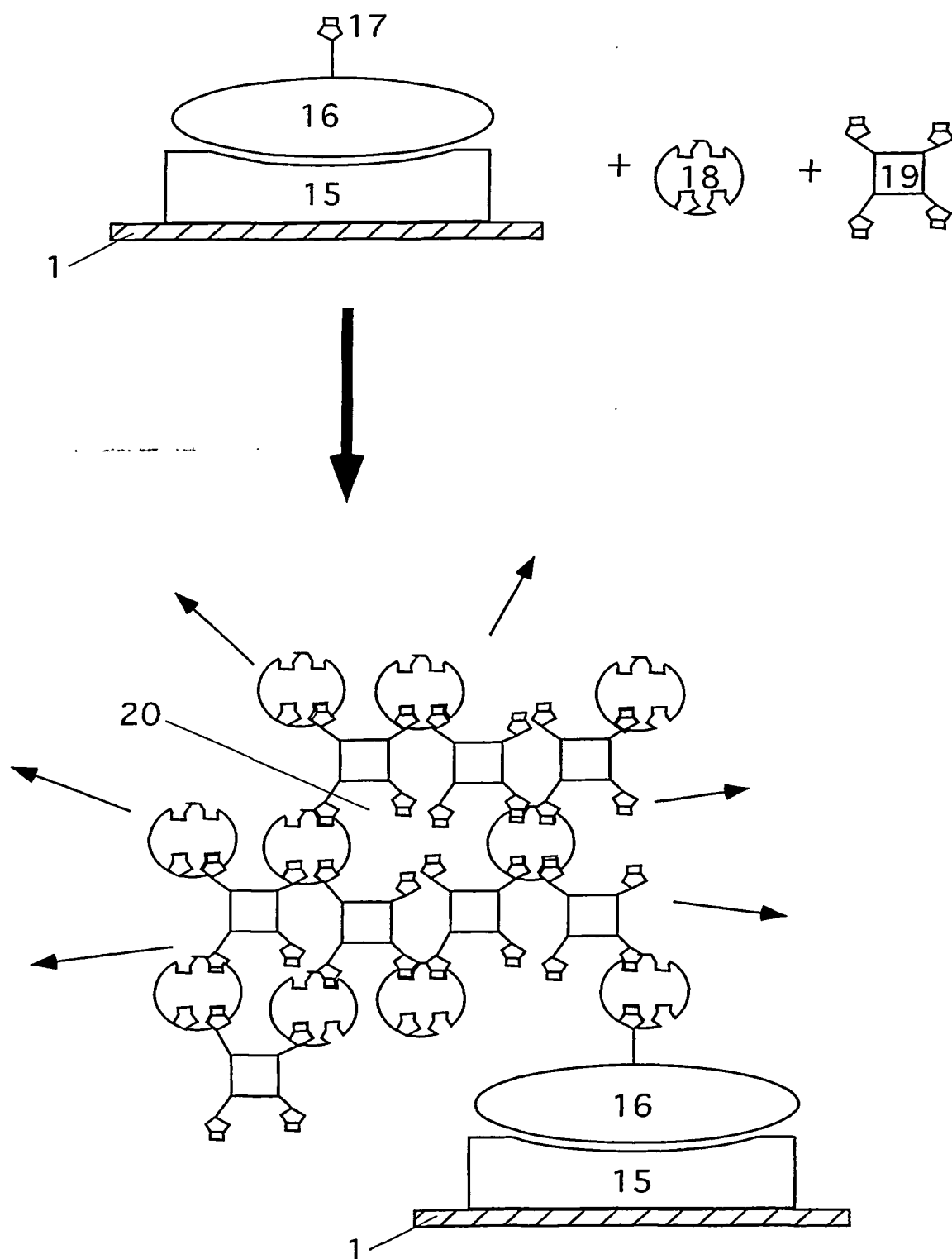


Fig. 5

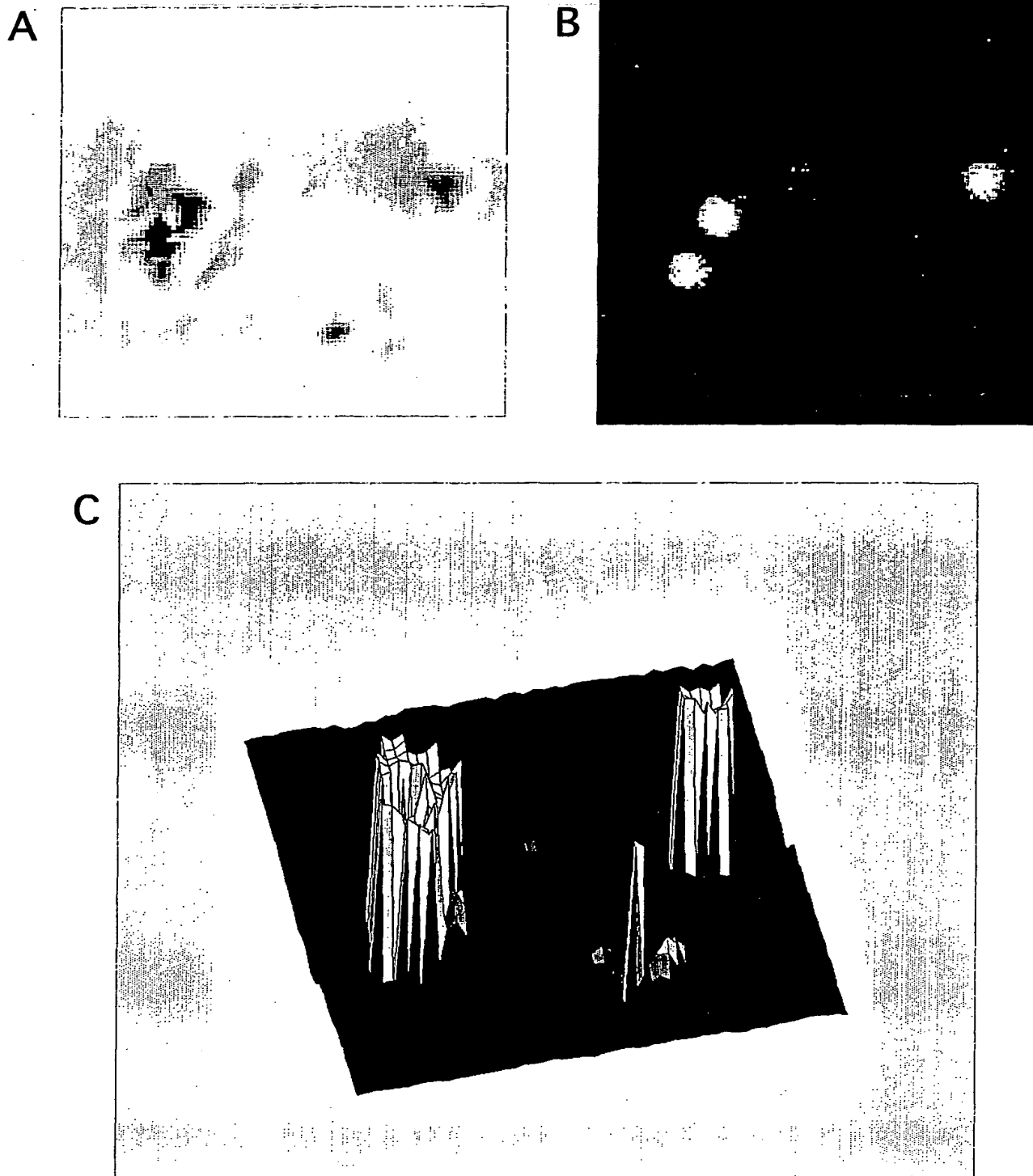


Fig. 6

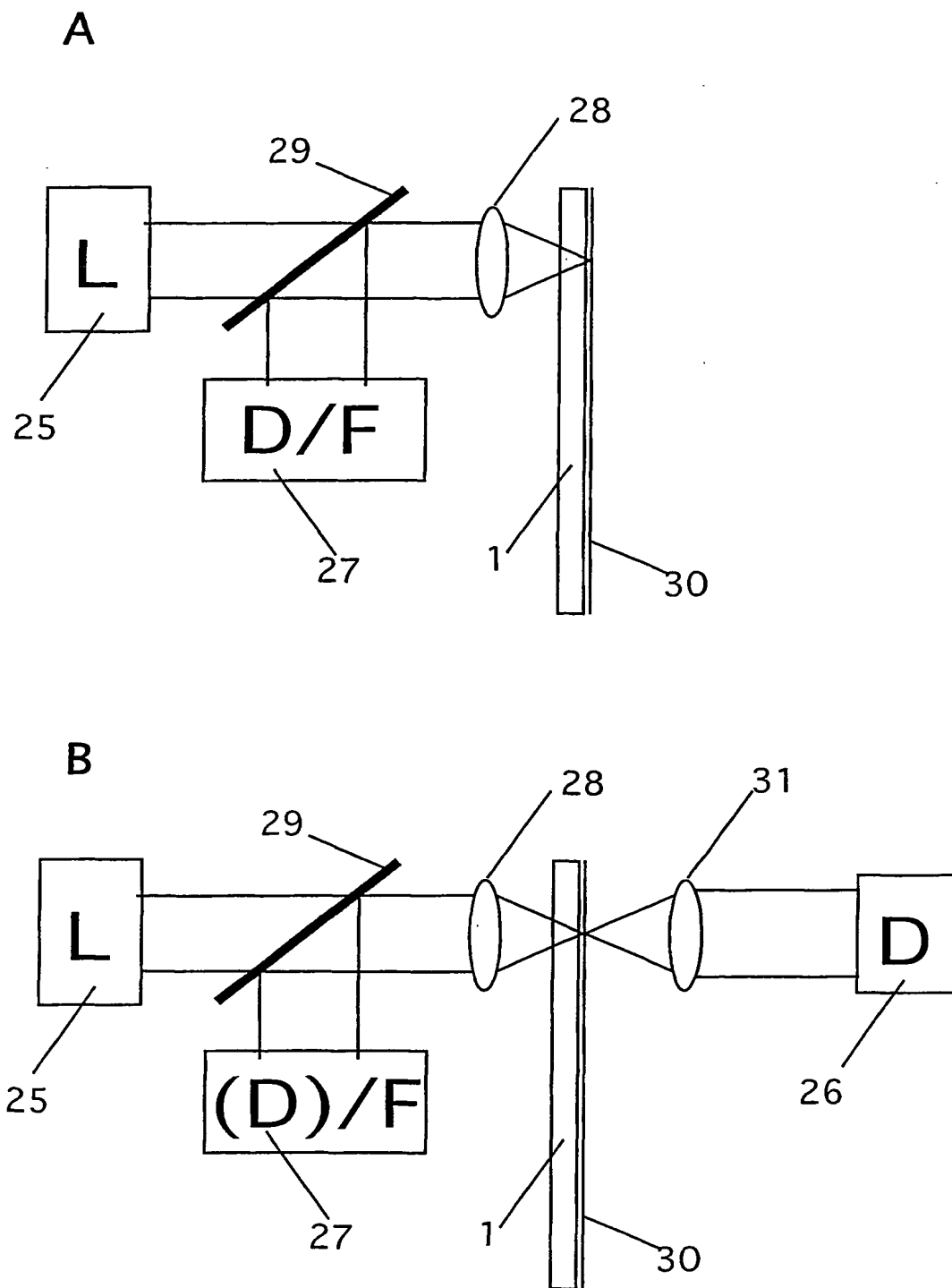


Fig. 7



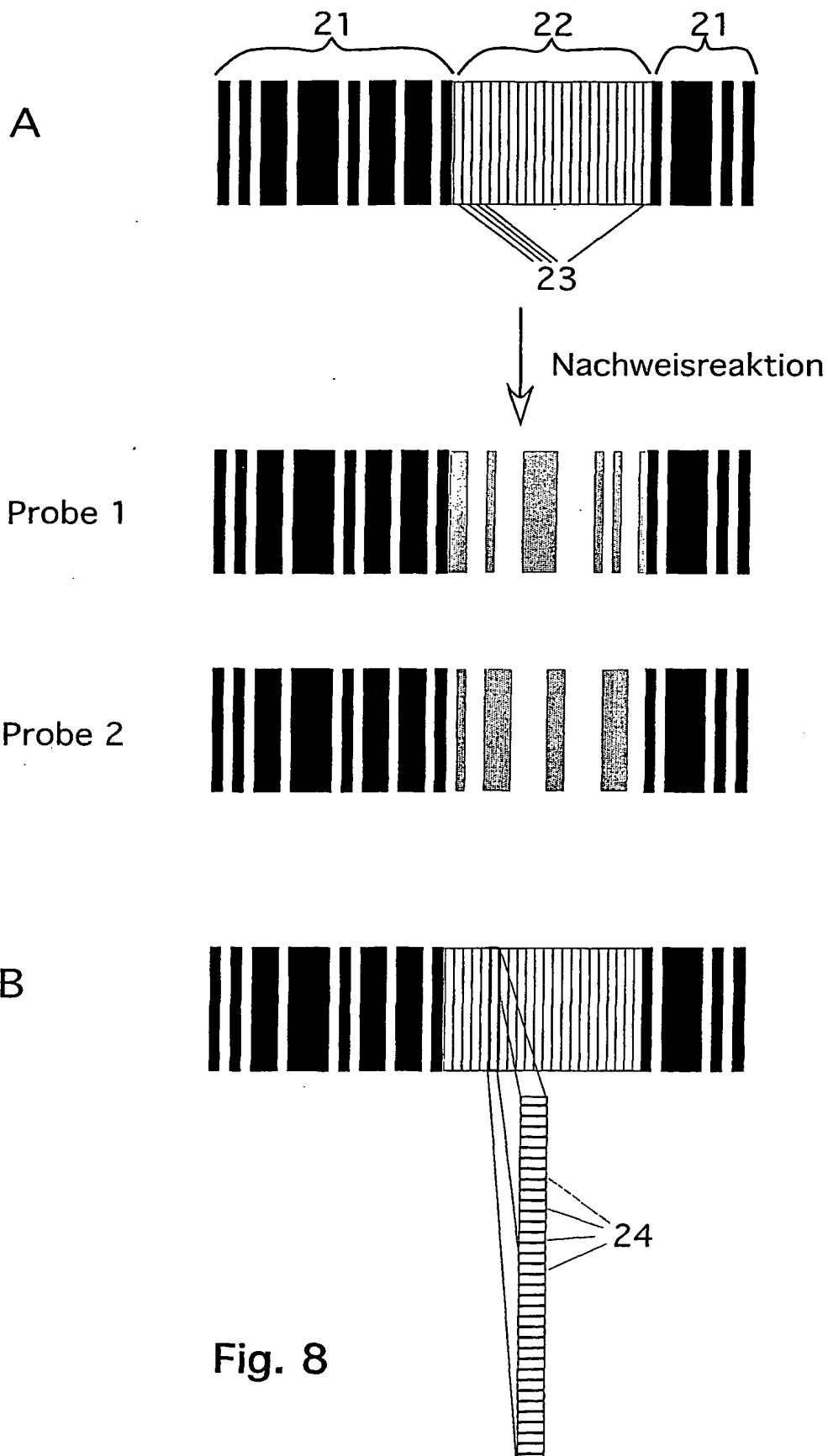
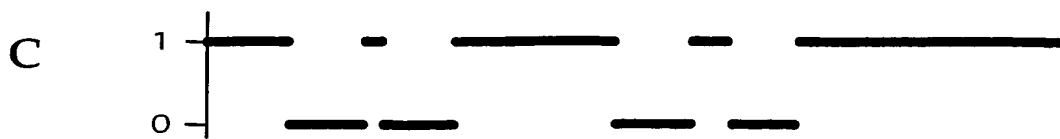
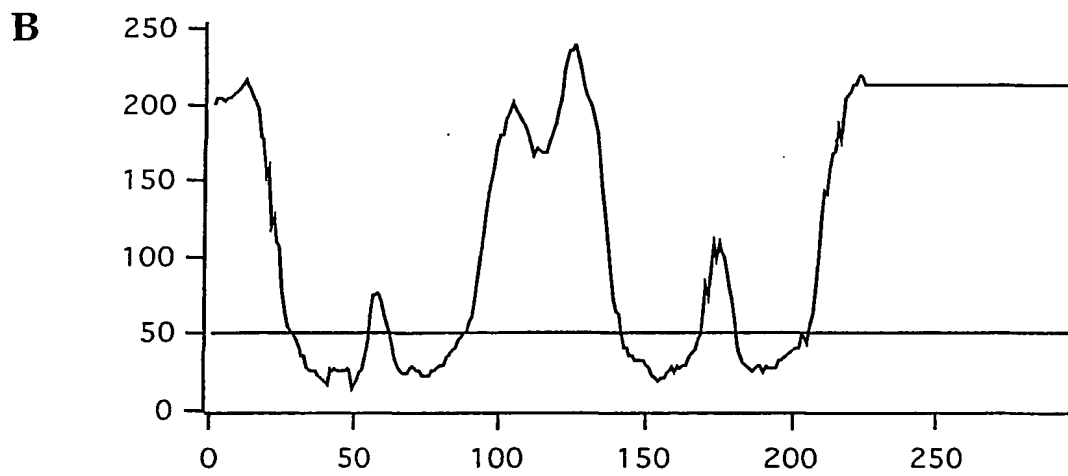
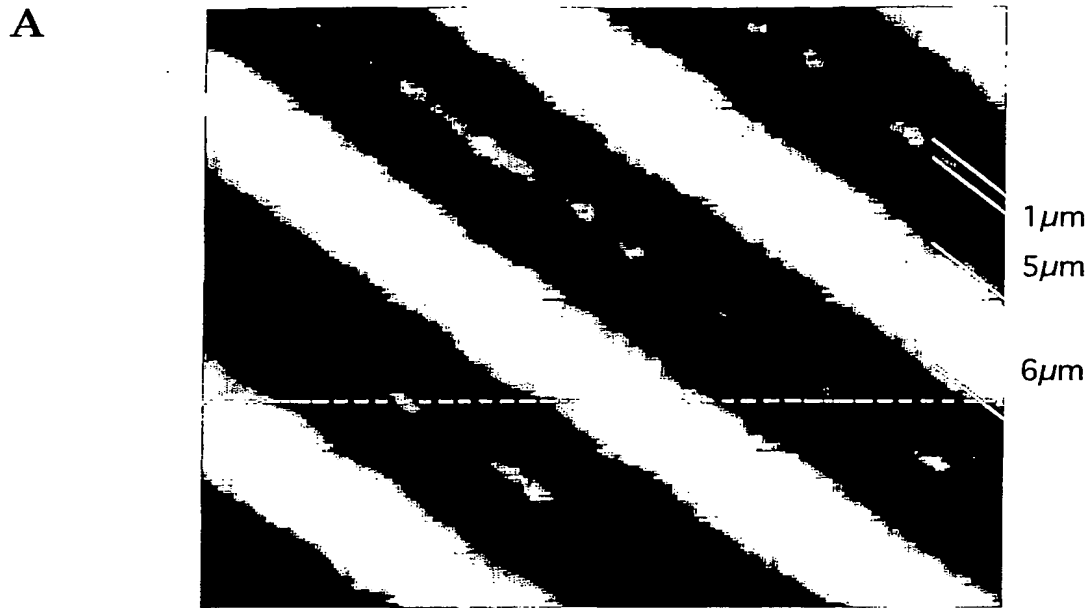


Fig. 8



**Fig. 9**

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
28. November 2002 (28.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2002/095651 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G06F 19/00**,  
G01N 35/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2002/001875

(22) Internationales Anmeldedatum:  
23. Mai 2002 (23.05.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 27 221.9 23. Mai 2001 (23.05.2001) DE  
101 27 220.0 23. Mai 2001 (23.05.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): LIFEBITS AG [DE/DE]; Albrechtstrasse 9, 72072  
Tübingen (DE).

(72) Erfinder; und

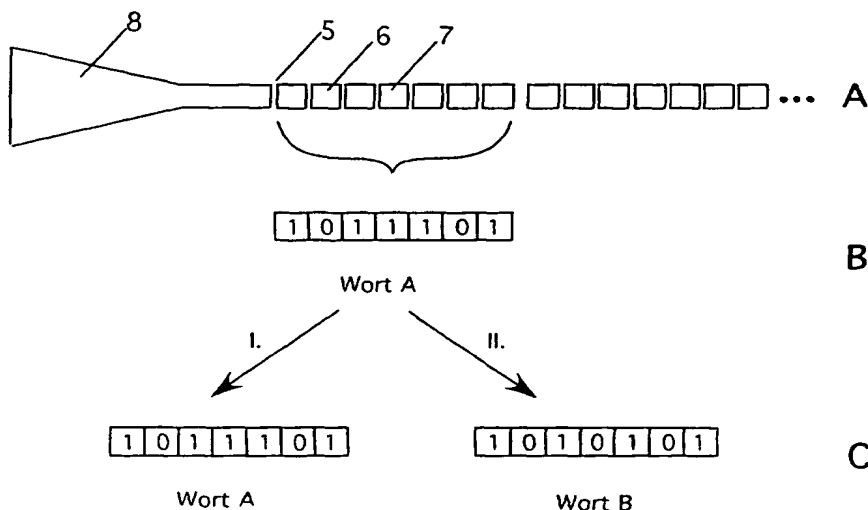
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REXHAUSEN, Ul-  
rich [DE/DE]; Riedstrasse 22, 72810 Gomaringen (DE).  
WICK, Manfred [DE/DE]; Wächterstrasse 40, 72074  
Tübingen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE BIOCHEMICAL DETECTION OF ANALYTES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN FÜR BIOCHEMISCHE NACHWEISE VON ANALYTEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting and/or quantifying analytes from a sample on an analysis carrier that has been formatted using a digital data code. Detection fields comprising the sensor elements required for the respective detection process, together with additional data structures in a defined digital format, are provided on the analysis carrier and combined to form sequences of formatted structures that can be interpreted as code words. To detect and quantify an analyte in a sample, the latter is applied to the analysis carrier and the formation of signal-generating elements is initiated at locations of molecular interaction. The localisation of signal-generating elements in the respective detection fields causes a formatted structure

at this location to be replaced by another. This leads to the conversion of one code word into another within the predetermined quantity of valid code words. Both code words can be sequentially read and interpreted in the predetermined format. The statement concerning a successful or unsuccessful reaction is based on a comparison of the respective code words prior to and after detection. Detection takes place using a reading device, which is preferably constructed from components of the consumer goods industry.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Detektion und/oder Quantifizierung von Analyten aus einer Probe auf einem mit einem digitalen Datencode formatierten Analysenträger. Auf dem Analysenträger sind Nachweisfelder mit den für den jeweiligen Nachweis benötigten Sensorelementen sowie weitere Datenstrukturen in einem definierten digitalen Format aufgebracht und zu Abfolgen von Formatstrukturen zusammengefasst, welche als Codewörter interpretiert werden können. Zum Nachweis und zur Quantifizierung eines Analyten in einer Probe wird diese auf den Analysenträger appliziert und die Ausbildung von signalgebenden Elementen an den Orten molekularer Interaktionen initiiert. Die Lokalisation von signalgebenden Elementen an den jeweiligen Nachweisfeldern bewirkt

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2002/095651 A3



KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Erklärung gemäß Regel 4.17:**

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

**Veröffentlicht:**

— *mit internationalem Recherchenbericht*  
— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:**

4. März 2004

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

einen Austausch einer Formatstruktur an dieser Stelle gegen eine andere. Dies führt zur Umwandlung eines Codewortes in ein anderes innerhalb der vorgegebenen Menge von gültigen Codewörtern. Beide Codewörter können im vorgegebenen Format sequentiell gelesen und interpretiert werden. Die Aussage über eine erfolgte oder nicht erfolgte Reaktion basiert auf einem Vergleich der jeweiligen Codewörter vor und nach dem Nachweis. Die Detektion erfolgt mit einem Lesegerät, das vorzugsweise aus Komponenten der Konsumgüterindustrie aufgebaut ist.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 02/01875

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G06F19/00 G01N35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G06F G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 200 755 B1 (VIRTANEN JORMA) 13 March 2001 (2001-03-13) abstract column 13, line 38 - line 53 column 8, line 28 - line 34 figure 2C column 15, line 21 - line 24 figure 11C column 25, line 30 - line 34	1-33
A	WO 00 26677 A (BURSTEIN LAB INC) 11 May 2000 (2000-05-11) abstract figure 23 figure 30 figure 36	1-33

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 December 2003

Date of mailing of the international search report

02/01/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chabros, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 02/01875

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6200755	B1	13-03-2001	AU 5080699 A	14-02-2000
			CA 2338401 A1	03-02-2000
			EP 1097378 A2	09-05-2001
			HU 0103577 A2	28-01-2002
			JP 2002521666 T	16-07-2002
			WO 0005582 A2	03-02-2000
			US 2003054376 A1	20-03-2003
			US 6342349 B1	29-01-2002
			US 2002106661 A1	08-08-2002
			AU 725065 B2	05-10-2000
			AU 3958597 A	02-02-1998
			BR 9710702 A	11-01-2000
			CA 2260361 A1	15-01-1998
			CN 1230216 A	29-09-1999
			EP 0918845 A1	02-06-1999
			IL 127938 A	12-09-2002
			JP 2002514046 T	14-05-2002
			KR 2000023613 A	25-04-2000
			NZ 333907 A	29-09-2000
			WO 9801533 A1	15-01-1998
			US 2001016316 A1	23-08-2001
			US 6331275 B1	18-12-2001
			US 2002076723 A1	20-06-2002
WO 0026677	A	11-05-2000	AU 1324400 A	22-05-2000
			CA 2349518 A1	11-05-2000
			CN 1332850 T	23-01-2002
			EP 1125136 A1	22-08-2001
			JP 2002530786 T	17-09-2002
			WO 0026677 A1	11-05-2000

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/01875

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 G06F19/00 G01N35/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G06F G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, EMBASE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 200 755 B1 (VIRTANEN JORMA) 13. März 2001 (2001-03-13) Zusammenfassung Spalte 13, Zeile 38 - Zeile 53 Spalte 8, Zeile 28 - Zeile 34 Abbildung 2C Spalte 15, Zeile 21 - Zeile 24 Abbildung 11C Spalte 25, Zeile 30 - Zeile 34	1-33
A	WO 00 26677 A (BURSTEIN LAB INC) 11. Mai 2000 (2000-05-11) Zusammenfassung Abbildung 23 Abbildung 30 Abbildung 36	1-33

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Dezember 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

02/01/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Chabros, C

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/01875

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6200755	B1	13-03-2001	
		AU 5080699 A	14-02-2000
		CA 2338401 A1	03-02-2000
		EP 1097378 A2	09-05-2001
		HU 0103577 A2	28-01-2002
		JP 2002521666 T	16-07-2002
		WO 0005582 A2	03-02-2000
		US 2003054376 A1	20-03-2003
		US 6342349 B1	29-01-2002
		US 2002106661 A1	08-08-2002
		AU 725065 B2	05-10-2000
		AU 3958597 A	02-02-1998
		BR 9710702 A	11-01-2000
		CA 2260361 A1	15-01-1998
		CN 1230216 A	29-09-1999
		EP 0918845 A1	02-06-1999
		IL 127938 A	12-09-2002
		JP 2002514046 T	14-05-2002
		KR 2000023613 A	25-04-2000
		NZ 333907 A	29-09-2000
		WO 9801533 A1	15-01-1998
		US 2001016316 A1	23-08-2001
		US 6331275 B1	18-12-2001
		US 2002076723 A1	20-06-2002
WO 0026677	A	11-05-2000	
		AU 1324400 A	22-05-2000
		CA 2349518 A1	11-05-2000
		CN 1332850 T	23-01-2002
		EP 1125136 A1	22-08-2001
		JP 2002530786 T	17-09-2002
		WO 0026677 A1	11-05-2000